

日 本 国 特 許 庁
JAPAN PATENT OFFICE

25.03.03

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office

出 願 年 月 日

Date of Application:

2002年 3月25日

出 願 番 号

Application Number:

特願2002-084280

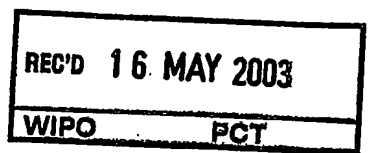
[ST.10/C]:

[JP2002-084280]

出 願 人

Applicant(s):

科学技術振興事業団
財団法人 ひろしま産業振興機構



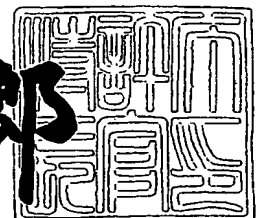
PRIORITY DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH
RULE 17.1(a) OR (b)

Best Available Copy

2003年 5月 2日

特 許 庁 長 官
Commissioner,
Japan Patent Office

太田 信一郎



出証番号 出証特2003-3031281

【書類名】 特許願

【整理番号】 NP02088-YS

【提出日】 平成14年 3月25日

【あて先】 特許庁長官 殿

【国際特許分類】 C12N 5/00

【発明の名称】 ヒト肝細胞増殖方法とヒト肝細胞の取得方法

【請求項の数】 33

【発明者】

 【住所又は居所】 広島県東広島市西条町御園字 6 0 9 1 - 1 1

 【氏名】 向谷 知世

【発明者】

 【住所又は居所】 広島県広島市八本松南 7 - 2 2 - 1 3

 【氏名】 吉里 勝利

【発明者】

 【住所又は居所】 広島県東広島市西条中央 4 - 4 - 3 4 - 3 0 3

 【氏名】 山崎 ちひろ

【特許出願人】

 【識別番号】 396020800

 【氏名又は名称】 科学技術振興事業団

【特許出願人】

 【識別番号】 596063056

 【氏名又は名称】 財団法人広島県産業技術振興機構

【代理人】

 【識別番号】 100093230

 【弁理士】

 【氏名又は名称】 西澤 利夫

 【電話番号】 03-5454-7191

【手数料の表示】

 【予納台帳番号】 009911

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【包括委任状番号】 0013341

【ブルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 ヒト肝細胞増殖方法とヒト肝細胞の取得方法

【特許請求の範囲】

【請求項1】 免疫不全肝障害マウスの肝臓にヒト肝細胞を移植し、補体抑制剤を投与しながらこの細胞移植マウスを飼育することによって、移植したヒト肝細胞をマウス肝臓で増殖させることを特徴とするヒト肝細胞増殖方法。

【請求項2】 免疫不全肝障害マウスが、遺伝的免疫不全マウスと遺伝的肝障害マウスとを交配して得られた子孫マウスである請求項1のヒト肝細胞増殖方法。

【請求項3】 子孫マウスが、ヘミ接合体免疫不全肝障害マウスである請求項2のヒト肝細胞増殖方法。

【請求項4】 ヘミ接合体免疫不全肝障害マウスに、肝細胞増殖阻害物質を投与した後、ヒト肝細胞を移植する請求項3のヒト肝細胞増殖方法。

【請求項5】 ヒト肝細胞を移植した免疫不全肝障害マウスに抗マウスFas抗体を投与する請求項1から4のいずれかのヒト肝細胞増殖方法。

【請求項6】 免疫不全肝障害マウスの肝臓に移植するヒト肝細胞が、増殖性ヒト肝細胞である請求項1のヒト肝細胞増殖方法。

【請求項7】 増殖性ヒト肝細胞が、コロニーを形成しながら増殖するヒト肝細胞を特異的に認識するモノクローナル抗体によって認識されたヒト肝細胞である請求項6のヒト肝細胞増殖方法。

【請求項8】 モノクローナル抗体が、Mouse-Mouse hybridoma K8223 (FERM P-18752) が産生するモノクローナル抗体である請求項6のヒト肝細胞増殖方法。

【請求項9】 以下のステップ(1)～(3)：

- (1) 免疫不全肝障害マウスの肝臓にヒト肝細胞を移植し、補体抑制剤を投与しながらこの細胞移植マウスを飼育することによって、移植したヒト肝細胞をマウス肝臓で増殖させるステップ；
- (2) マウス肝臓から増殖したヒト肝細胞を単離するステップ；および
- (3) 単離したヒト肝細胞を、複数の免疫不全肝障害マウスの肝臓に移植し、補

体抑制剤を投与しながらこれらの細胞移植マウスを50日以上飼育するステップ、からなり、ステップ(2)および(3)を1回以上繰り返すことを特徴とするヒト肝細胞大量増殖方法。

【請求項10】 ステップ(1)および／または(3)において、免疫不全肝障害マウスが、遺伝的免疫不全マウスと遺伝的肝障害マウスとを交配して得られた子孫マウスである請求項8のヒト肝細胞大量増殖方法。

【請求項11】 子孫マウスが、ヘミ接合体免疫不全肝障害マウスである請求項10のヒト肝細胞大量増殖方法。

【請求項12】 ヘミ接合体免疫不全肝障害マウスに肝細胞増殖阻害物質を投与した後、ヒト肝細胞を移植する請求項11のヒト肝細胞大量増殖方法。

【請求項13】 ステップ(1)および／または(3)において、ヒト肝細胞を移植した免疫不全肝障害マウスに抗マウスFas抗体を投与する請求項9から12のいずれかのヒト肝細胞大量増殖方法。

【請求項14】 ステップ(1)および／または(3)において免疫不全肝障害マウスの肝臓に移植するヒト肝細胞が、増殖性ヒト肝細胞である請求項9のヒト肝細胞大量増殖方法。

【請求項15】 増殖性ヒト肝細胞が、コロニーを形成しながら増殖するヒト肝細胞を特異的に認識するモノクローナル抗体によって認識されたヒト肝細胞である請求項14のヒト肝細胞大量増殖方法。

【請求項16】 モノクローナル抗体が、Mouse-Mouse hybridoma K8223 (FERM P-18752) が産生するモノクローナル抗体である請求項15のヒト肝細胞大量増殖方法。

【請求項17】 ステップ(2)において、以下の(a)および(b)：

(a) マウス肝臓から分離した肝臓組織をコラゲナーゼ処理する；および

(b) 非ヒト肝細胞は認識せず、ヒト肝細胞を特異的に認識するモノクローナル抗体によって認識された細胞を単離する、

の少なくとも一方を行うことによって、実質的にヒト肝細胞のみを単離する請求項9のヒト肝細胞大量増殖方法。

【請求項18】 モノクローナル抗体が、Mouse-Mouse hybridoma K8216 (F

ERM P-18751) が産生するモノクローナル抗体である請求項 1 7 のヒト肝細胞大量増殖方法。

【請求項 1 9】 請求項 1 から 8 のいずれかのヒト肝細胞増殖方法、または請求項 9 から 1 8 のいずれかのヒト肝細胞大量増殖方法によって増殖させたヒト肝細胞を肝臓内に有するキメラマウス。

【請求項 2 0】 増殖したヒト肝細胞が、肝臓内の細胞の 70% 以上を占めている請求項 1 9 のキメラマウス。

【請求項 2 1】 請求項 1 9 または 2 0 のキメラマウスの肝臓からヒト肝細胞を単離することを特徴とするヒト肝細胞取得方法。

【請求項 2 2】 以下の(a)および(b)：

(a) マウス肝臓から分離した肝臓組織をコラゲナーゼ処理する；および

(b) 非ヒト肝細胞は認識せず、ヒト肝細胞を特異的に認識するモノクローナル抗体によって認識された細胞を単離する、

の少なくとも一方を行うことによって、実質的にヒト肝細胞のみを単離する請求項 2 1 のヒト肝細胞大量増殖方法。

【請求項 2 3】 モノクローナル抗体が、Mouse-Mouse hybridoma K8216 (FERM P-18751) が産生するモノクローナル抗体である請求項 2 2 の取得方法。

【請求項 2 4】 請求項 2 1 から 2 3 のいずれかの方法によって取得されたヒト肝細胞。

【請求項 2 5】 請求項 2 4 のヒト肝細胞を含む細胞キット。

【請求項 2 6】 請求項 2 4 のヒト肝細胞を充填したハイブリッド型人工肝臓。

【請求項 2 7】 コロニーを形成しながら増殖するヒト肝細胞を特異的に認識するモノクローナル抗体。

【請求項 2 8】 Mouse-Mouse hybridoma K8223 (FERM P-18752) が産生する請求項 2 7 のモノクローナル抗体。

【請求項 2 9】 Mouse-Mouse hybridoma K8223 (FERM P-18752) 。

【請求項 3 0】 請求項 2 7 のモノクローナル抗体によって特異的に認識された増殖性ヒト肝細胞。

【請求項 3 1】 非ヒト肝細胞は認識せず、ヒト肝細胞を特異的に認識するモノクローナル抗体。

【請求項 3 2】 Mouse-Mouse hybridoma K8216 (FERM P-18751) が産生する請求項 3 1 のモノクローナル抗体。

【請求項 3 3】 Mouse-Mouse hybridoma K8216 (FERM P-18751)。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

この出願の発明は、マウス体内でヒト肝細胞を増殖させる方法、肝臓内にヒト肝細胞を有するキメラマウス、キメラマウスからのヒト肝細胞の取得方法と、これによって取得されたヒト肝細胞に関するものである。このようにしてキメラマウスから得られたヒト肝細胞は、肝細胞キットや体外型人工肝臓の材料となる。

【0002】

【従来の技術】

肝臓は500種類以上もの多種多様な特異機能を有する。肝臓の主な機能として、血漿蛋白質の合成分泌、糖新生やグリコーゲン代謝による血糖調節、脂質合成、尿素合成、胆汁合成分泌、解毒などが挙げられる。

【0003】

体内に取り込まれた物質の多くは肝臓で代謝される。医薬品開発の領域では、医薬品候補物質が肝臓でどのような代謝を受け、肝臓やその他の臓器や組織にどのような影響を与えるかは必須のデータである。さらに、これまで多くの化学物質が合成され環境へも放出されている。これらの物質が個々に、あるいは複合して人体にどのような影響をおよぼすかを解明することは、社会的にも非常に重要であり、このような化学物質の人体への影響評価にも肝機能に対する毒性試験が必要とされている。

【0004】

医薬品候補物質をはじめとする化学物質の安全性試験や薬物代謝試験には、現在のところ、マウス、ラット、ウサギ、イヌ、サル等が使われている。特に医薬品開発ではヒトを対象とする第一相試験へ入る前に、動物を用いた毒性試験・安

全性試験が義務づけられているが、これには多大な時間と労力を必要とし、投資額も莫大なものとなる。

【0005】

しかしながら、これらの動物実験で得られるデータがそのままヒトに適應される保証はない。事実、動物実験では毒性の認められなかった物質がヒトに対して毒性を示す例は多く、また逆の場合もあり得る。したがって、これまで多くの医薬品候補物質がヒトを対象とする第一相試験に入ってから開発中止となったり、また、動物実験では毒性が強いために臨床試験に入る前に開発中止となった物質においても、実際にはヒトには毒性が認められないケースも多く存在しているものと予想される。

【0006】

このことは、ヒトの肝臓における代謝機能とマウスやラットの肝臓における代謝機能の違いが起因していると考えられている。最近では、ヒト肝細胞を用いた *in vitro* 代謝試験や毒性試験が行われるようになった。ところが、移植に用いられなかった脳死患者の肝臓や腫瘍摘出などによる切除肝から得られるヒト肝細胞の量は需要をはるかに下回っている。したがって、ヒト肝細胞の増殖技術の開発は医薬品開発において必要とされている。

【0007】

また、大量のヒト肝細胞の必要性は、体外型人工肝臓においても同様である。人工肝臓は、人工的に肝臓機能を代行するための医療装置であり、吸着、透析、濾過等の物理化学的原理に基づく人工的な作用と、摘出肝や肝組織の灌流による生物学的作用を組み合わせたハイブリッド型の人工肝臓の開発が精力的に進められている。この人工肝臓の開発に当たっては、物理化学的機能を向上させるための膜や回路の性能向上とともに、ヒトへの適用が可能な大量の肝細胞の供給が不可欠とされている。

【0008】

しかしながら、ヒトの肝細胞については、これまで成熟個体から単離した初代細胞を継代的に培養することは不可能であるとされてきた。すなわち、接着依存性の成熟肝細胞は、その継代操作のために培養基質から剥離する際に大きく損傷

し、また培養基質に再接着させることも困難なためである。これに対し、この出願の発明者らは、ヒト肝臓から分離した正常肝細胞からクローン性増殖能を有する小型肝細胞を単離し、この小型肝細胞を初代培養し、さらにこの培養肝細胞を継代培養して肝細胞を増殖させる方法を発明し、特許を取得している（日本特許第3211941号公報）。

【 0 0 0 9 】

この特許発明の方法は、*in vitro*で肝細胞を増殖させて大量のヒト肝細胞を得るための新しい手段を提供するものであるが、長期間の継代培養中に幾つかの肝機能が低下してしまうという問題点を有していた。このため、例えば肝機能を維持するための薬剤のスクリーニング系として、あるいは長期間の継代培養後も保存されている特定の機能について薬剤の毒性や薬効を試験する系としては有用であるが、ヒト肝機能代替としての肝細胞として、またはハイブリット型人工肝臓の材料としては不十分な点も存在する。

【 0 0 1 0 】

*in vitro*での肝細胞の増殖における以上のとおりの問題点を解消するための手段として、動物個体内 (*in vivo*) でヒト肝細胞を増殖させる方法が提案されている。

【 0 0 1 1 】

例えば、Heckelらは、アルブミンウロキナーゼトランスジェニックマウスを製作している。このマウスにおいては、アルブミンのエンハンサーとプロモーターにウロキナーゼプラスミノゲンアクチベーター (uPA) 遺伝子が接続してあるため、肝臓特異的にuPA蛋白が合成される (Heckel JL, Sandgren EP, Degen JL, Palmiter RD, and Brinster RL. Neonatal bleeding in transgenic mice expressing urokinase-type plasminogen activator. Cell 62: 447-456, 1990)。肝細胞はuPA蛋白による傷害で、肉眼的には白色を呈し、出血や肝不全により死亡する個体もみられる。このマウスの脾臓よりlacZトランスジェニックマウスの正常肝細胞を移植すると、肝臓に生着・増殖し、最終的にはドナー肝細胞で置き換わることが知られている (Rhim JA, Sandgren EP, Degen JL, Palmiter RD, and Brinster RL. Replacement of diseased mouse liver by hepatic cell transp

lantation. Science 263:1149-1152, 1994)。さらにRhimらは、uPAトランスジェニックマウスと胸腺を生まれつき欠損しているためT細胞の機能を持たないNUDEマウスを掛け合わせ、uPA-Tg/NUDEマウスを作製した。uPA-Tg/NUDEマウスにラットの肝細胞を移植することにより、ラット肝細胞を持つマウスを作製した (Rhim JA, Sandgren EP, Palmiter RD and Brinster RL. Complete reconstitution of mouse liver with xenogeneic hepatocytes. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92: 4942-4946, 1995)。しかし、このマウスを用いたヒト肝細胞を持つキメラマウスの報告はない。

【 0 0 1 2 】

Dandriらは、uPA-Tgマウスと免疫不全の性質を持つノックアウトマウスRag2マウスを掛け合わせ、uPA-Tg/Rag2マウスを作製した。uPA-Tg (+/-) /Rag2マウスの肝臓へヒトの肝臓から採取したヒト肝細胞を移植し、マウス肝臓の15%が置き換わったことを示した。彼らはこのマウスへのB型肝炎ウィルスの感染に成功している (Dandri M, Burda MR, Torok B, Pollok JM, Iwanska A, Sommer G, Rogiers X, Rogler CE, Gupta S, Will H, Greten H, and Petersen J. Repopulation of mouse liver with human hepatocytes and in vivo infection with hepatitis B virus. Hepatology 33:981-988, 2001)。

【 0 0 1 3 】

また、この出願の発明者らは、先に特許出願した発明 (特開2002-45087号公報) において、免疫不全マウスであるSCIDマウスとuPA-Tgとを掛け合わせたuPA-Tg/SCIDマウスにヒト肝細胞を移植し、この移植肝細胞が実質的にマウスの肝機能を担っているキメラマウスを開示している。この先願発明のキメラマウスは、uPA遺伝子の発現によってマウス肝細胞が機能不全となっているため、その肝機能は移植されたヒト肝細胞によって保たれている。このため、移植したヒト肝細胞の個体内機能を正しく評価することができ、被検物質の毒性や薬効を判定するための実験動物個体としては極めて有用である。しかしながら、この先願発明のキメラマウスの場合には、ヒト肝細胞の移植から50日以上は生存することができず、また成長の過程で正常化したマウス肝細胞が増殖するため、移植ヒト肝細胞の増殖効率は低く、ヒト肝細胞の置換率は約50%程度にとどまっていた。

【 0 0 1 4 】

このことはまた、最近のMercerらの報告 (Mercer DF, Schiller DE, Elliott JF, Douglas DF, Hao C, Riehn A, Addison WR, Fischer KP, Churchill TA, Lakey JRT, Tyrrell DLJ and Keteman NM. Hepatitis C virus replication in mice with chimeric human livers. Repopulation of mouse liver with human hepatocytes and in vivo infection with hepatitis B virus. Nature Medicine 7:927-933, 2001) によっても裏付けられている。Mercerらは、この出願の発明者らと同様にしてuPA-Tg/SCIDを作製し、凍結保存したヒト肝細胞を融解して移植した結果、マウス血清中に2 mg/ml未満のヒトアルブミンが検出され（血液中に換算すると約1 mg/ml未満）、肝臓の約50%がヒト肝細胞で置き換わったことを報告している。

【 0 0 1 5 】

【発明が解決しようとする課題】

以上のとおり、免疫不全肝障害マウス (uPA-Tg/SCIDマウス) にヒト肝細胞を移植してキメラマウスを作成することは、そのキメラマウス自体に有用性（例えば、ヒト肝細胞に対する毒性や薬効のin vivo試験等）は存在するものの、マウス個体内で移植肝細胞を大量に増殖させるための手段としては、不十分であった。

【 0 0 1 6 】

また、ヒト肝細胞を移植したキメラマウスは長期間生存することができず、また成長の過程でマウス肝細胞が増殖してしまうため、ヒト肝細胞に対する毒性や薬効のin vivo評価系としてもその利用対象が限定されていた。

【 0 0 1 7 】

この出願の発明は、ヒト肝細胞の増殖方法として、マウス体内でヒト肝細胞を十分に増殖させるための改良された方法を提供することを課題としている。

【 0 0 1 8 】

また、長期間生存することによって、マウス体内で増殖したヒト肝細胞を分離回収する方法を提供することも課題としている。

【 0 0 1 9 】

さらに、分離したヒト肝細胞を複数のマウスに移植してマウス体内で増殖させることにより一定の規格のヒト肝細胞を体内に持つキメラマウスを大量に得ること、そのマウスから分離した一定規格のヒト肝細胞を大量に得る方法を提供することも課題としている。

【 0 0 2 0 】

さらには、分離したヒト肝細胞の利用方法を提供することを課題としている。

【 0 0 2 1 】

またさらに、この出願は、前記の各発明を実施するために有用なモノクローナル抗体や、そのモノクローナル抗体を産生する新規ハイブリドーマ細胞株を提供することを課題としてもいる。

【 0 0 2 2 】

【課題を解決するための手段】

この出願は、前記の課題を解決するための第 1 の発明として、免疫不全肝障害マウスの肝臓にヒト肝細胞を移植し、補体抑制剤を投与しながらこの細胞移植マウスを飼育することによって、移植したヒト肝細胞をマウス肝臓で増殖させることを特徴とするヒト肝細胞増殖方法を提供する。

【 0 0 2 3 】

この第 1 発明の方法においては、免疫不全肝障害マウスが、遺伝的免疫不全マウスと遺伝的肝障害マウスとを交配して得られた子孫マウスであることを好ましい態様としている。また、この子孫マウスがヘミ接合体免疫不全肝障害マウスであること、そしてこのヘミ接合体免疫不全肝障害マウスに肝細胞増殖阻害物質を投与した後、ヒト肝細胞を移植することをそれぞれ好ましい態様としてもいる。

【 0 0 2 4 】

さらにこの第 1 発明およびその好ましい前記態様においては、ヒト肝細胞を移植した免疫不全肝障害マウスに抗マウス Fas 抗体を投与することを別の好ましい態様としている。

【 0 0 2 5 】

この第 1 発明の方法においては、また、免疫不全肝障害マウスの肝臓に移植するヒト肝細胞が、増殖性ヒト肝細胞であること、その増殖性ヒト肝細胞が、コロ

ニーを形成しながら増殖するヒト肝細胞を特異的に認識するモノクローナル抗体によって認識されたヒト肝細胞であること、そしてモノクローナル抗体が、Mouse-Mouse hybridoma K8223 (FERM P-18752) が産生するモノクローナル抗体であることをそれぞれ好ましい態様としている。

【 0 0 2 6 】

この出願は、第2の発明として、以下のステップ(1)～(3)：

- (1) 免疫不全肝障害マウスの肝臓にヒト肝細胞を移植し、補体抑制剤を投与しながらこの細胞移植マウスを飼育することによって、移植したヒト肝細胞をマウス肝臓で増殖させるステップ；
 - (2) マウス肝臓から増殖したヒト肝細胞を単離するステップ；および
 - (3) 単離したヒト肝細胞を、複数の免疫不全肝障害マウスの肝臓に移植し、補体抑制剤を投与しながらこれらの細胞移植マウスを飼育するステップ、
- からなり、ステップ(2)および(3)を1回以上繰り返すことを特徴とするヒト肝細胞大量増殖方法を提供する。

【 0 0 2 7 】

この第2発明の方法においては、前記ステップ(1)および／または(3)において、免疫不全肝障害マウスが、遺伝的免疫不全マウスと遺伝的肝障害マウスとを交配して得られた子孫マウスであること、子孫マウスがヘミ接合体免疫不全肝障害マウスであること、そして、このヘミ接合体免疫不全肝障害マウスに肝細胞増殖阻害物質を投与した後、ヒト肝細胞を移植することをそれぞれ好ましい態様としている。

【 0 0 2 8 】

さらにこの第2発明および前記の好ましい態様においては、前記ステップ(1)および／または(3)において、ヒト肝細胞を移植した免疫不全肝障害マウスに抗マウスFas抗体を投与することを別の好ましい態様としてもいる。

【 0 0 2 9 】

またさらに、この第2発明の方法においては、前記ステップ(1)および／または(3)において免疫不全肝障害マウスの肝臓に移植するヒト肝細胞が、増殖性ヒト肝細胞であること、増殖性ヒト肝細胞がコロニーを形成しながら増殖するヒト

肝細胞を特異的に認識するモノクローナル抗体によって認識されたヒト肝細胞であること、そしてモノクローナル抗体がMouse-Mouse hybridoma K8223 (FERM P-18752) が産生するモノクローナル抗体であることをそれぞれ好ましい態様としている。

【0030】

この第2発明の方法においては、さらに、前記ステップ(2)において、以下の(a)および(b)：

(a) マウス肝臓から分離した肝臓組織をコラゲナーゼ処理する；および

(b) 非ヒト肝細胞は認識せず、ヒト肝細胞を特異的に認識するモノクローナル抗体によって認識された細胞を単離する、

の少なくとも一方を行うことによって、実質的にヒト肝細胞のみを単離することを好ましい態様としている。そして、この態様においては、モノクローナル抗体がMouse-Mouse hybridoma K8216 (FERM P-18751) が産生するモノクローナル抗体であることをさらに好ましい態様としている。

【0031】

この出願は、第3の発明として、前記の第1発明または第2発明の方法によって増殖させたヒト肝細胞を肝臓内に有するキメラマウスを提供する。

【0032】

この第3発明のキメラマウスは、増殖したヒト肝細胞が肝臓内の細胞の70%以上を占めていることを好ましい態様としている。

【0033】

この出願はさらに、第4の発明として、前記第3発目のキメラマウスの肝臓からヒト肝細胞を単離することを特徴とするヒト肝細胞取得方法を提供する。

【0034】

第4発明の方法においては、以下の(a)および(b)：

(a) マウス肝臓から分離した肝臓組織をコラゲナーゼ処理する；および

(b) 非ヒト肝細胞は認識せず、ヒト肝細胞を特異的に認識するモノクローナル抗体によって認識された細胞を単離する、

の少なくとも一方を行うことによって、実質的にヒト肝細胞のみを単離すること

を好ましい態様としている。そしてこの態様においては、モノクローナル抗体が Mouse-Mouse hybridoma K8216 (FERM P-18751) が産生するモノクローナル抗体であることをさらに好ましい態様としている。

【 0 0 3 5 】

この出願は、第 5 の発明として、前記第 4 発明の方法によって取得されたヒト肝細胞を提供する。

【 0 0 3 6 】

さらにこの出願は、第 6 の発明として、前記第 5 発明のヒト肝細胞を含む細胞キットを提供する。

【 0 0 3 7 】

さらにまた、この出願は、第 7 の発明として、前記第 5 発明のヒト肝細胞を充填したハイブリッド型人工肝臓を提供する。

【 0 0 3 8 】

この出願は、第 8 の発明として、コロニーを形成しながら増殖するヒト肝細胞を特異的に認識するモノクローナル抗体を提供する。

【 0 0 3 9 】

この第 8 発明の一例は、Mouse-Mouse hybridoma K8223 (FERM P-18752) が産生するモノクローナル抗体である。

【 0 0 4 0 】

この出願は、また第 9 の発明として、前記第 8 発明のモノクローナル抗体によって特異的に認識された増殖性ヒト肝細胞を提供する。

【 0 0 4 1 】

さらにまた、この出願の発明は、第 1 0 の発明として、非ヒト肝細胞は認識せず、ヒト肝細胞を特異的に認識するモノクローナル抗体を提供する。

【 0 0 4 2 】

この第 9 発明の一例は、Mouse-Mouse hybridoma K8216 (FERM P-18751) が産生するモノクローナル抗体である。

【 0 0 4 3 】

【発明の実施の形態】

第1発明のヒト肝細胞増殖方法は、ヒト肝細胞を免疫不全肝障害マウスの肝臓に移植し、このマウスに「補体抑制剤」を投与しながら飼育することにより、移植したヒト肝細胞をマウス肝臓で増殖させることを特徴とする。

【0044】

前記のMercerら (Nature Medicine 7:927-933, 2001) は免疫不全肝障害マウス (uPA-Tg/SCIDマウス) を作製し、凍結保存したヒト肝細胞を融解してマウスに移植した結果、肝臓の50%程度がヒト肝細胞で置き換わったことを報告している。しかしながら、Mercerらの作製したヒト肝細胞移植マウスは、移植したヒト肝細胞の高い置換率が達成できていない。

【0045】

第1発明の方法は、マウスに補体抑制剤を投与することにより、移植したヒト肝細胞が作る補体がマウス本体を攻撃することを防止することによって、ヒト肝細胞移植マウスを50日以上も生存させることを可能としている。そして、このように50日以上もマウスを生存させることによって、マウス肝臓の細胞を、70%以上ヒト肝細胞に置換させることを可能とするものである。

【0046】

補体抑制剤としては、nafamostat mesilate (フサン^R; 鳥居製薬)、gabexate mesilate (FOY^R; 小野製薬)、comostat mesilate (フオイパン^R; 小野製薬)、cobra venom factor (コブラ毒) 等を用いることができる。なお、これらの補体抑制剤は、細胞移植や臓器移植の際に使用される薬剤である。ただし、通常の移植術においては、補体抑制剤は、レシピエントの肝臓が産生する補体が移植細胞や移植臓器を攻撃することを防ぐために使用される。一方、この発明においては、レシピエントであるマウスは肝障害のために自らは補体を産生しないと考えられるため、補体抑制剤は、移植したヒト肝細胞が産生する補体がレシピエントマウスを攻撃することを防ぐために使用される。

【0047】

第1発明のヒト肝細胞増殖方法に使用する「免疫不全肝障害マウス」は、マウス本来の肝細胞が障害を受けている「肝障害マウス」であり、かつ、異種動物由来の細胞に対して拒絶反応を示さない「免疫不全マウス」である。従って、免疫

不全肝障害マウスは、肝障害誘発処置と免疫不全処置とを同一マウス個体に施すことによって作製することができる。肝障害誘発処置は、例えば公知の肝障害誘発物質（例えば、四塩化炭素、D-ガラクトサミン、2-アセチルアミノフルオレン、ピロロジナルカロイドなど）による処理、あるいは外科的な肝切除等である。また、免疫不全処置としては、免疫抑制剤の投与や胸腺摘出等である。

【0048】

ただし、この第1発明の方法では、遺伝的な肝障害形質を有するマウスと遺伝的に免疫不全であるマウスとを交配し、その子孫個体として得られた免疫不全肝障害マウスを使用することを好ましい態様としている。遺伝的肝障害マウスとしては、前記Rhimら（Science, 263, 1149 (1994)）が作成したuPA-Tgマウスを例示することができる。あるいは肝障害を生じさせる遺伝子（例えば、tissue-type plasminogen activator遺伝子等）を用い、公知のトランスジェニック法（Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:7380-7384, 1980）によりトランスジェニック免疫不全肝障害マウスを作成することもできる。また、肝機能を担う遺伝子（例えば、フマリルアセト酢酸ヒドラーゼ遺伝子等）を公知のジーンターゲティング法（Science 244:1288-1292, 1989）によってノックアウトすることによっても、遺伝的な肝障害を有するマウスを得ることができる。一方、遺伝的な免疫不全マウスとしては、SCIDマウス、NUDEマウス、RAG2トランスジェニックマウス等の公知のマウスを使用することができる。以下、このようにして得られたマウスを「遺伝的免疫不全肝障害マウス」と記載する。

【0049】

遺伝的免疫不全肝障害マウスは、肝障害遺伝子がホモ接合体であるマウスを用いることが好ましい。このようなホモ接合体マウスは正常な肝細胞がほとんど増殖しないため、ヒト肝細胞の増殖をマウス肝細胞が妨げることがない。ただし、このようなホモ接合体マウスは、ヘミ接合体同士を掛け合わせた場合、確率的に1/4の割合でしか得ることができない。

【0050】

一方、肝障害遺伝子がヘミ接合体である遺伝的免疫不全肝障害マウス（「ヘミ接合体免疫不全肝障害マウス」）は、ヘミ接合体同士を掛け合わせた場合、また

はヘミ接合体とSCIDマウスを掛け合わせた場合1/2の確立で得ることができるため、第1発明の低コストでの実施が可能となる。しかし、ヘミ接合体免疫不全肝障害マウスは、2倍体染色体の一方の遺伝子が正常であるため、肝障害遺伝子の欠失により正常肝細胞がコロニーを形成しながら増殖して生後7週頃にはマウス肝臓を正常なマウス肝細胞が占めるようになる。このため、一般的には、ヘミ接合体免疫不全肝障害マウスはヒト肝細胞を増殖させるためのレシピエントマウスとして適さない。そこでこの第1発明の好ましい態様として、ヘミ接合体免疫不全肝障害マウスにヒト肝細胞を移植する前に、肝細胞特異的に増殖を阻害する物質を投与し、正常化したマウス肝細胞が増殖してコロニーを形成することを予防する。肝細胞増殖阻害物質としては、たとえばpyrrolizidine alkaloidの一種であるretrorsine、lasiocarpine、seneciophylline、monocrotaline、trichodesmine等を例示することができる。

【0051】

第1発明の方法において、移植に用いるヒト肝細胞は、正常なヒト肝組織から常法によって単離したものをを用いることができる。この第1発明の方法においては、特にin vivoで活発な増殖能を有する増殖性肝細胞を使用することを好ましい態様としている。

【0052】

このような増殖性ヒト肝細胞は、一例として、この出願の発明者らが発明したヒト小型肝細胞を用いることができる。すなわち、この出願の発明者は、ラットあるいはヒトの肝臓に増殖能の高い小型肝細胞が含まれることを見いだし、すでに特許出願している（特開平8-112092号公報；クローン性増殖能を有する肝実質細胞とその取得法、並びに継代培養方法、特開平10-179148号公報；ヒト小型肝細胞の取得方法と、この細胞の初代培養および継代培養法）。また、関連の論文も発表している（Chise Tateno, and Katsutoshi Yoshizato: Growth and differentiation in culture of clonogenic hepatocytes that express both phenotypes of hepatocytes and biliary epithelial cells. American Journal of Pathology 149:1593-1605, 1996. Hiroshi Hino, Chise Tateno, Hajime Sato, Chihiro Yamasaki, Shigeru Katayama, Toshihiko Kohashi, Akio Aratani, Toshi

masa Asahara, Kiyohiko Dohi, and Katsutoshi Yoshizato: A long-term culture of human hepatocytes which show a high growth potential and express their differentiated phenotypes. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 256: 184-191, 1999. Chise Tatenno, Kaori Takai-Kajihara, Chihiro Yamasaki, Hajime Sato, and Katsutoshi Yoshizato: Heterogeneity of growth potential of adult rat hepatocytes in vitro. *Hepatology* 31: 65-74, 2000. Shigeru Katayama, Chise Tatenno, Toshimasa Asahara, and Katsutoshi Yoshizato: Size-dependent in vivo growth potential of adult rat hepatocytes. *American Journal of Pathology* 158: 97-105, 2001.)。このヒト小型肝細胞は、その優れた増殖能によって、レシピエントの体内で急速に増殖し、正常な肝機能を発揮するヒト肝細胞集団を短時間で形成することができる。

【0053】

このような小型肝細胞の採取は、前記の先願発明に記載されているような遠心分離を用いた方法の他、エルトリエーターやFACS等の細胞分画装置によっても採取することができる。さらには、コロニーを形成しながら増殖する肝細胞を特異的に認識するモノクローナル抗体によって採取することもできる。in vitroで増殖させたヒト肝細胞、凍結保存肝細胞、テロメラーゼ遺伝子等の導入により不死化させた肝細胞、これらの肝細胞と非実質細胞を混合させたものでも可能である。

【0054】

増殖性ヒト肝細胞の別の例は、コロニーを形成しながら増殖するヒト肝細胞を特異的に認識するモノクローナル抗体によって認識されたヒト肝細胞である。

【0055】

モノクローナル抗体は、公知のモノクローナル抗体作製法（「単クローン抗体」、長宗香明、寺田弘共著、廣川書店、1990年；"Monoclonal Antibody" James W. Goding, third edition, Academic Press, 1996）に従い、例えば以下の様な手順で作製することができる。

1：ハイブリドーマ細胞の作製

継代培養したヒト正常肝細胞を含む免疫原を用いて哺乳動物を免疫し、必要に

応じて適宜に追加免疫して動物を十分に感化する。次いでこの動物から抗体産生細胞（リンパ細胞または脾臓細胞）を摘出し、これとミエローマ（骨髓種）細胞株との融合細胞を得る。そして、これらの融合細胞株から、目的とするモノクローナル抗体を産生する細胞を選択し、培養することによって、ハイブリドーマ細胞を得ることができる。以下、各工程を詳しく説明する。

a) 免疫原の調製

正常肝組織からコラゲナーゼで分離したヒト肝細胞を継代培養し、免疫原とする。ヒト肝細胞は、4回以上、好ましくは6回以上の継代が可能な、例えば15歳以下のヒト肝組織から分離したものを使用することが好ましい。

b) 動物の免疫

被免疫動物としては、公知のハイブリドーマ作製法に用いられる哺乳動物を使用することができる。具体的には、たとえばマウス、ラット、ヤギ、ヒツジ、ウシ、ウマ等である。ただし、摘出した抗体産生細胞と融合させるミエローマ細胞の入手容易性等の観点からは、マウスまたはラットを被免疫動物とするのが好ましい。また、実際に使用するマウスおよびラットの系統は特に制限はなく、マウスの場合には、たとえば各系統A、AKR、BALB/c、BDP、BA、CE、C3H、57BL、57BR、C57L、DBA、FL、HTH、HT1、LP、NZB、NZW、RF、RIII、SJL、SWR、WB、129等が、またラットの場合には、たとえば、Low、Lewis、Sprague、Dawley、ACI、BN、Fischer等を用いることができる。このうち、後述のミエローマ細胞との融合適合性を勘案すれば、マウスではBALB/c系統が、ラットではlow系統が被免疫動物として特に好ましい。なお、これらマウスまたはラットの免疫時の週齢は5～12週齢が好ましい。

【0056】

動物の免疫は、免疫原である継代ヒト肝細胞を、 $10^4 \sim 10^8$ 個程度、動物の皮内または腹腔内に投与することによって行うことができる。免疫原の投与スケジュールは被免疫動物の種類、個体差等により異なるが、一般には、抗原投与回数1～6回、複数回の場合は投与間隔1～2週間が好ましい。

c) 細胞融合

上記の投与スケジュールの最終免疫日から1～5日後に被免疫動物から抗体産生

細胞を含む脾臓細胞またはリンパ細胞を無菌的に取り出す。これらの脾臓細胞またはリンパ細胞からの抗体産生細胞の分離は、公知の方法に従って行うことができる。

【 0 0 5 7 】

次いで、抗体産生細胞とミエローマ細胞とを融合する。このミエローマ細胞には特段の制限はなく、公知の細胞株から適宜に選択して用いることができる。ただし、融合細胞からハイブリドーマを選択する際の利便性を考慮して、その選択手続が確立しているHGPRT (Hypoxanthine-guanine phosphoribosyl transferase) 欠損株を用いるのが好ましい。すなわち、マウス由来のX63-Ag8(X63)、NS1-Ag4/1(NS-1)、P3X63-Ag8.U1(P3U1)、X63-Ag8.653(X63.653)、SP2/0-Ag14(SP2/0)、MPC11-45.6TG1.7(45.6TG)、F0、S149/5XX0,BU.1等、ラット由来の210.RSY3.Ag.1.2.3(Y3)等、ヒト由来のU266AR(SK0-007)、GM1500・GTG-A12(GM1500)、UC729-6、LICR-LOW-HMy2(HMy2)、8226AR/NIP4-1(NP41)等である。

【 0 0 5 8 】

抗体産生細胞とミエローマ細胞との融合は、公知の方法に従い、細胞の生存率を極度に低下させない程度の条件下で適宜実施することができる。そのような方法は、例えば、ポリエチレングリコール等の高濃度ポリマー溶液中で抗体産生細胞とミエローマ細胞とを混合する化学的方法、電気的刺激を利用する物理的方法等を用いることができる。

【 0 0 5 9 】

融合細胞と非融合細胞の選択は、例えば、公知のHAT (ヒポキサンチン・アミノプテリン・チミジン) 選択法により行うのが好ましい。この方法は、アミノプテリン存在下で生存し得ないHGPRT欠損株のミエローマ細胞を用いて融合細胞を得る場合に有効である。すなわち、未融合細胞および融合細胞をHAT培地で培養することにより、アミノプテリンに対する耐性を持ち合わせた融合細胞のみを選択的に残存させ、かつ増殖させることができる。

d) ハイブリドーマのスクリーニング

目的とするモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ細胞のスクリーニングは、公知の酵素免疫検定法 (EIA: Enzyme Immunoassay)、放射線免疫測定法

(RIA : Radio Immunoassay) 、 蛍光抗体法等により行うことができる。

【 0 0 6 0 】

このようなスクリーニングによって、高い増殖能を有するヒト肝細胞と特異的に結合するモノクローナル抗体をそれぞれに産生するハイブリドーマ細胞群が得られる。

【 0 0 6 1 】

なお、スクリーニング後のハイブリドーマ細胞は、メチルセルロース法、軟アガロース法、限界希釈法等の公知の方法によりクローニングし、抗体産生に用いる。

【 0 0 6 2 】

以上の通りの方法によって得たハイブリドーマ細胞は、液体窒素中または-80℃以下の冷凍庫中に凍結状態で保存することができる。この出願は、このようなハイブリドーマ細胞の具体例として、Mouse-Mouse hybridoma K8223 (FERM P-18752) を提供する。

2 : モノクローナル抗体の取得および精製

上記1で作製したハイブリドーマ細胞を公知の方法で培養することによって、増殖性ヒト肝細胞と特異的に結合するモノクローナル抗体を得ることができる。

【 0 0 6 3 】

培養は、例えば、前記のクローニング法で使用した同じ組成の培地中で培養してもよく、あるいはモノクローナル抗体を大量に産生するためには、マウス腹腔内にハイブリドーマ細胞を注射し、腹水からモノクローナル抗体を採取してもよい。

【 0 0 6 4 】

このようにして得たモノクローナル抗体は、例えば硫酸塩析法、ゲル濾過法、イオン交換クロマトグラフィー法、アフィニティークロマトグラフィー法等により精製することができる。

【 0 0 6 5 】

この出願はまた、モノクローナル抗体の具体例として、前記のハイブリドーマ (Mouse-Mouse hybridoma K8223) が産生するモノクローナル抗体を提供する。

【 0 0 6 6 】

以上のようなモノクローナル抗体が認識する増殖性ヒト肝細胞は、抗体への認識に応じて、公知のEIA、RIA、蛍光抗体法等により高純度で得ることができる。

【 0 0 6 7 】

以上のとおりのヒト肝細胞、とくに増殖性ヒト肝細胞を免疫不全肝障害マウスに移植するには、実施例に示したように、マウスの脾臓を経由して肝臓へ移植することができる。また、直接門脈から移植することも可能である。移植するヒト肝細胞の数は、1～10000個程度とすることができる。

【 0 0 6 8 】

さらにこの第1発明の方法では、ヒト肝細胞を移植したマウスに、抗マウスFas抗体を投与することを好ましい態様の一つとしている。抗マウスFas抗体は、マウス肝細胞のFas抗原に反応し、アポトーシスを誘導する作用を持つ。ヒト肝細胞を移植したマウスに抗マウスFas抗体を投与することにより、マウスの肝細胞はアポトーシスを起こし、死滅する。この抗体はヒト肝細胞には影響を与えないため、移植したヒト肝細胞のみが選択的に増殖することができる。この方法により、マウス肝臓におけるヒト肝細胞による置換率をさらに上昇させることが可能となる。

【 0 0 6 9 】

次に、第2発明のヒト肝細胞大量増殖方法について説明する。

【 0 0 7 0 】

第2発明の方法は、以下のステップ(1)～(3)を行うことを特徴とする。

ステップ(1)：第1発明の方法と同様にしてヒト肝細胞をマウス肝臓内で増殖させる。

ステップ(2)：マウス肝臓内で増殖したヒト肝細胞を単離する。

ステップ(3)：単離したヒト肝細胞を、複数の免疫不全肝障害マウスにそれぞれ移植し、第1発明の方法と同様にしてヒト肝細胞を増殖させる。

【 0 0 7 1 】

そして、この第2発明の方法は、前記ステップ(2)および(3)を1回以上繰り返す。すなわち、ステップ(1)において1匹のマウスに移植したヒト肝細胞は、その

マウス肝臓内で約100倍まで増加する。従って、ステップ(2)において増殖ヒト肝細胞が全て回収されれば、ステップ(3)においては、原理的には、100匹のマウスにヒト肝細胞を移植することができ、最終的には、最初に移植したヒト肝細胞の100×100倍のヒト肝細胞を回収することができる。さらに、ステップ(2)および(3)を2回繰り返すことによって、最初に移植したヒト肝細胞の100×100×100倍のヒト肝細胞を回収することができる。

【 0 0 7 2 】

この第2発明の方法では、ステップ(1)および／またはステップ(3)を前記の第1発明方法またはその好ましい態様方法と同一に行うことができる。ここで、「および／または」とは、前記第1発明方法における1つの要件を、ステップ(1)でのみ行ってもよく、ステップ(3)でのみ行ってもよく、あるいはステップ(1)および(3)の両方で行ってもよいことを意味する。例えば、ステップ(1)では、前記のモノクローナル抗体によって認識されたヒト増殖性肝細胞をマウスに移植し、ステップ(3)では回収されたヒト肝細胞の全てを移植用として使用するようにしてもよい。前記第1発明における各要件は、ヒト肝細胞を増殖させたマウス個体、またはマウスから回収したヒト肝細胞の用途等に応じて、適宜に選択して行うことができる。

【 0 0 7 3 】

第2発明のステップ(2)は、ステップ(1)〔ステップ(2)および(3)を繰り返す場合は、その直前のステップ(3)〕において増殖させたヒト肝細胞をマウス肝臓から単離するステップである。分離方法は様々な方法（例えば、コラゲナーゼ灌流法等）を採用することができるが、以下の方法(a)および(b)の少なくとも一方を行うことが好ましい。

方法(a)：

マウス肝臓から分離した肝臓組織をコラゲナーゼ処理することによって、実質的にヒト肝細胞のみを回収する。コラゲナーゼの細胞毒性は、マウス肝細胞に対する方がヒト肝細胞に対するより高いため、コラゲナーゼによる消化時間を調節することにより、マウス肝細胞にダメージを与え、ヒト肝細胞のみを分取することもできる。コラゲナーゼ処理の時間は、ヒト肝細胞とマウス肝細胞との割合に

よっても異なるが、例えば、ヒト肝細胞が70%以上の場合は、8~20分間程度の処理を行えばよい。

方法(b)：

非ヒト肝細胞は認識せず、ヒト肝細胞を特異的に認識するモノクローナル抗体によって認識された細胞を単離することによって、純度の高いヒト肝細胞を回収する。このようなモノクローナル抗体は、ヒト肝細胞のみを特異的に認識する抗体産生ハイブリドーマをスクリーニングすることを除き、前記の「増殖性ヒト肝細胞を認識するモノクローナル抗体」と同様の方法によって得ることができる。この出願は、そのようなモノクローナル抗体の具体例として、Mouse-Mouse hybridoma K8216 (FERM P-18751) が産生するモノクローナル抗体を提供する。

【0074】

この出願の第3発明は、前記の第1発明または第2発明の方法によって増殖させたヒト肝細胞を肝臓内に有する「キメラマウス」である。このキメラマウスは、好ましくはヒト肝細胞の移植から50日以上、さらに好ましくは70日以上生存したマウスである。またこのキメラマウスは、マウス肝臓の70%以上、好ましくは90%以上、さらに好ましくは98%以上がヒト肝細胞で占められているマウスである。

【0075】

このような第3発明のキメラマウスは、例えば薬剤の薬効や毒性がヒト肝細胞に及ぼす影響を試験するための実験動物として有用である。なお、このようなキメラマウスの利用は、この出願の発明者らによる先願発明（特開2002-45087号公報：キメラ動物）を参照することができる。また、第2発明の大量増殖方法によって増殖させたヒト肝細胞を肝臓内に有するキメラマウスの集団は、同一のヒト由来の肝細胞をそれぞれに有するキメラマウスの集団であり、大規模な試験を等しい条件で行うことを可能にする。

【0076】

この出願の第4発明は、前記第3発明のキメラマウスからヒト肝細胞を単離する方法である。この方法は、前記第2発明のステップ(2)と同様にして行うことができる。

【 0 0 7 7 】

この出願の第 5 発明は、前記第 4 発明の方法によってキメラマウスの肝臓から単離したヒト肝細胞である。このヒト肝細胞は、マウス個体内で増殖したことによって、実質的にヒト肝臓組織の正常肝細胞と同一の肝機能を有している。従って、この第 5 発明のヒト肝細胞によって、薬物代謝試験や安全性試験などに用いることができるヒト肝細胞キット（第 6 発明）や、ハイブリッド型人工肝臓（第 7 発明）が提供される。さらに、ハイブリッド型人工肝臓に使用するモジュール（ヒト肝細胞を充填したモジュール）を使用して、ヒト肝細胞が生産する有用物質を回収することができる。

【 0 0 7 8 】

ヒト肝細胞細胞キットは、細胞の種類や用途に応じて各種のもの公知であり、当業者であれば、第 5 発明のヒト肝細胞と公知の細胞キットの構成を採用することによって、第 6 発明の細胞キットを容易に作製することができる。また、モジュールやハイブリッド型人工臓器の構成も公知であり、当業者であれば第 7 発明の人工肝臓等を容易に作製することができる。

【 0 0 7 9 】

この出願は、さらに第 8 の発明として、コロニーを形成しながら増殖するヒト肝細胞を特異的に認識するモノクローナル抗体を提供する。このようなモノクローナル抗体の一例は、Mouse-Mouse hybridoma K8223 (FERM P-18752) が産生するモノクローナル抗体である。

【 0 0 8 0 】

この第 8 発明のモノクローナル抗体は、前記第 1 発明および第 2 発明において、増殖性ヒト肝細胞を特定するために使用することができる。また、このようなモノクローナル抗体は、マウスへの移植用の増殖性ヒト肝細胞だけでなく、ヒト肝臓組織から増殖性のヒト肝細胞を単離するためにも使用することができる。

【 0 0 8 1 】

この出願はそして、第 9 の発明として、前記第 8 発明のモノクローナル抗体によって特異的に認識された増殖性ヒト肝細胞を提供する。この第 9 発明の増殖性ヒト肝細胞は、前記第 1 発明および第 2 発明においてマウスに移植するヒト肝細胞

胞として使用することができる。また、大量のヒト肝細胞を使用する様々な医療分野、基礎研究分野等において極めて有用である。

【0082】

さらにまた、この出願の発明は、第10の発明として、非ヒト肝細胞は認識せず、ヒト肝細胞を特異的に認識するモノクローナル抗体を提供する。このようなモノクローナル抗体の一例は、Mouse-Mouse hybridoma K8216 (FERM P-18751) が産生するモノクローナル抗体である。

【0083】

この第10発明のモノクローナル抗体は、前記第2発明および第4発明の方法において、マウス肝臓からヒト肝細胞のみを分離するために使用することができる。また、この第10発明のモノクローナル抗体は、非ヒト肝細胞は認識しないため、マウス以外の非ヒト動物の体内でヒト肝細胞を増殖させた場合、あるいは非ヒト肝細胞とヒト肝細胞を混合培養した場合に、ヒト肝細胞を単離、精製するために使用することができる。

【0084】

以下、実施例を示してこの出願の発明についてさらに詳細かつ具体的に説明するが、この出願の発明は以下の例によって限定されるものではない。

【0085】

【実施例】

実施例1：ヒト肝細胞を増殖させたキメラマウスの作成

免疫不全肝障害マウスの肝臓にヒト肝細胞を移植し、肝臓内でヒト肝細胞を増殖させたキメラマウスを作製した。作成の材料、方法、および各種試験の結果は以下のとおりであった。

1 材料

- (a) アルブミンウロキナーゼアクティベータートランスジェニックマウス
(uPA-Tg):B6SJL-TgN (Alb1Plau) 144Bri
- (b) スキッドマウス (Scid): C. B-17/Icr Scidjcl
- (c) nafamostat mesilate
- (d) retrorsineレトロルシン

(e) ヒト肝細胞

なお、マウス(a)はThe Jackson Laboratory、マウス(b)は日本クレアよりそれぞれ購入した。薬品(c)は鳥居製薬社製(商品名:フサン)、(d)はSIGMA社製を購入した。

【0086】

また、細胞(c)は以下のとおりに調製した。肝切除術を行う患者にインフォームドコンセントを実施し、承諾を得た後に切除肝より正常肝臓組織を得て、UW液で灌流し、4℃で運搬した。正常肝臓組織からコラゲナーゼ処理により肝臓分散液を得た。低速遠心分離法(50g、2分)で沈殿と上澄みに分離し、培地で洗浄後肝細胞数をカウントした。凍結保存する場合は、凍結保存液(クラボウ製)を加え、プログラムフリーザーを用いて凍結した。液体窒素に保存してある沈殿または上澄みの肝細胞を37℃の恒温水槽で融解し、細胞数をカウントした。 4×10^7 個/mlになるように、移植直前に培地で調整した。

2 方法と結果

2.1 免疫不全肝障害マウスの作製

uPA-Tgマウス(hemizygote, +/-)とSCIDマウス(homozygote, +/-)を掛け合せ、両方の形質を持つマウスTg(+/-)/SCID(+/-)を35.2%の確率で得た。Tg(+/-)とTg(-/-)の識別は、Tg遺伝子に特異的な配列をプライマーに用い、ゲノムPCR法により行った。また、SCID(+/-)とSCID(-/-)の識別は、PCR-RFLP法により行った。

【0087】

次に、得られたTg(+/-)/SCID(+/-)をSCID(+/+)と戻し交配させ、Tg(+/-)/SCID(+/+)を得た。その結果、Tg(+/-)は37.9%出現し、SCID(+/+)は52.8%出現した。Tg(+/-)/SCID(+/+)同士を交配させ、目的のTg(+/-)/SCID(+/+)およびTg(+/+)/SCID(+/+)を得た。

【0088】

なお、uPA遺伝子のホモとヘテロの識別は以下の方法で行った。

【0089】

生後8~10日目のマウスの尾を約5 mm切断し、Qiagen DNeasy Tissue Kitを用いてゲノムDNAを抽出した。抽出したDNAの濃度および純度を吸光度計を用いて測

定した。master mix 25 μ l, primer F 1 μ l, primer R 1 μ l, Taqman probe 1 μ lにDNAと蒸留水を加え、全量を50 μ lに調整し、定量性PCRを行った (ABI7700, Sequencer Detector, PE Applied Biosystems)。プライマーおよびTaqman probeはuPA遺伝子導入のためのベクターに含まれるヒト生長ホルモンのコード配列を対象として以下のとおりに設計した。

【0090】

primer F: gtcttggctcgctgcaatc (SEQ ID No: 1)

primer R: cgggagactgaggcaggag (SEQ ID No: 2)

Taqman probe: ccgcctcctgggttcaagcga (SEQ ID No: 3)

またとコントロールとして、マウス G3PDHを対象とする以下のプライマーおよびTaqman probeを用いた。

【0091】

primer F: ggatgcagggatgatgttc (SEQ ID No: 4)

primer R: tgcaccaccaactgcttag (SEQ ID No: 5)

Taqman probe: cagaagactgtggatggccctc (SEQ ID No: 6)

PCR条件は、95℃で10分変性の後、95℃で15秒変性と60℃で1分伸長を50サイクル行った。ヒト生長ホルモンのコード配列の増幅断片の量を、内部コントロールのマウス G3PDHコード配列の増幅断片量で割った相対値により、ゲノムDNA中の導入遺伝子の量を比較した。標準曲線はサンプルの中のヘテロかホモのマウスのゲノムの希釈系列を用いた。標準に用いたマウスの値を1とし、そのマウスがヘテロだった場合は、ヘテロが1に近い数値を示し、ホモは2に近い数値を示す。標準に用いたマウスがホモだった場合は、ホモが1に近い数値を示し、ヘテロは0.5に近い数値を示す。解剖時の肉眼所見により、この方法による正答率は約90%と推定している。

2.2 uPA-Tg/SCIDマウスへのヒト肝細胞の移植

生後14～48日目のTg(+)/SCID(+)/マウスをエーテルで麻酔し、脇腹を約5 mm切開し、脾頭より $4-8 \times 10^7$ 個/mlの濃度の細胞懸濁液を10-12.5 μ lずつ ($4-10 \times 10^5$ 個) 注入した後、止血した。腹腔に止血剤e-aminocaproic acid (SIGMA)を0.02 g/mlの濃度で40 μ lずつ投与し、脾臓を腹腔に戻し縫合した。Tgマウスの

肝細胞で作られたuPAは細胞外へ分泌されるため、血中のuPA濃度が高い。uPAは、蛋白質分解やプラズミンogenからplasminへの活性化を触媒したり、fibrin clotを分解する働きがある。このため、生後、多くのマウスが、腸管や腹腔内で出血をおこし生後4日以内に死に至るといわれている。手術時の出血による死亡を避けるため、plasminogen activatorおよびplasminの作用を阻止し止血作用の効果を有するε-aminocaproic acidを投与した。

【0092】

掛け合わせに用いたSCID/C.B-17マウスは、T細胞B細胞は持たないが、NK細胞を持つことが知られている。そこで、移植したヒト肝細胞がマウスのNK細胞に攻撃されないように、NK活性を阻害するasialo GM1抗体を移植前日と移植翌日に腹腔内に投与した。生後4週で離乳させ、生後5週から雌雄を別ケージで飼育した。

2.3 マウス血中におけるヒトアルブミンのモニタリング

ヒト肝細胞移植後1週間目より、週1回または2回ずつマウスの尾より血液を10 μ l採血し、ヒトアルブミン濃度をQuantitative ELISA immunoassay (Bethyl laboratories Inc.) を用いて測定した。

【0093】

ヒト肝細胞を移植した19匹のTg(+)/SCIDマウス中11匹のマウス血中でヒトアルブミンが増加し(図1)、高いもので、8 mg/ml以上に達し、この値はマウス血中アルブミンの62%に相当した。

2.4 ヒト肝細胞により産生されるヒト補体および補体抑制剤の投与

血中ヒトアルブミンが3 mg/mlを越えたマウスが急速に状態が悪くなり死亡するケースが見られた(図1)。死亡動物には肺の出血が観察され、ヒト肝細胞による補体産生による影響が認められた。マウス肝臓組織中のヒト肝細胞をヒト補体C3に対する抗体を用いて免疫染色を行ったところ、ヒト肝細胞にC3の存在が確認された。そこで、ヒトアルブミン濃度が高くなったマウスに2 mg/ml濃度の補体抑制剤(フサン) 200 μ lを投与した。投与頻度は2日に1回から開始した。体重の変化を毎日観察し、体重減少が見られたら、投与頻度や濃度を増加していった(図2)。その結果、血中ヒトアルブミン濃度が2 mg/mlを越えたマウスには補体抑制剤(フサン)を隔日、4 mg/mlを越えたマウスには毎日、さらに6 mg/mlを

越えたマウスには1日2回投与することとした(図2)。この処理により、血中ヒトアルブミン濃度が3 mg/mlを越えてもマウスが長期間生存でき、高いもので8 mg/mlのヒトアルブミンを検出できるようになった(図1)。

2.5 ビタミンCおよびSCIDマウス血清の投与

ヒト肝細胞はビタミンCを合成できないため、ヒト肝細胞で置換された肝臓を持つマウスはビタミンC欠乏症となる可能性が考えられた。そのため、ヒト肝細胞を移植したマウスにはascorbic acid 2-phosphateを1 mg/mlの濃度で溶かした飲料水を与えた(日本クレア アスコルビン酸合成能欠如ラットの飼育方法を参考にした)。

【0094】

また、ヒト肝細胞を移植したTg(+)/SCIDマウスはTg(+/-)/SCIDマウスに比べて体重増加が遅く毛並みも悪い。マウス肝臓中のヒト肝細胞が合成する蛋白や酵素などがマウスの成長や体の維持に不十分である可能性が考えられたので、SCIDマウス血清を50 μ lずつ週に1回皮下に投与した。SCIDマウス血清を投与したものと投与していないTg(+)/SCIDマウスの体重増加量を比較したところ、投与したマウスの方が上回った。

2.6 マウス肝臓の肉眼的病理検査および組織学的病理検査

マウスをエーテル麻酔下で採血し、血清中アルブミンおよびGPT値を測定した。肝臓と脾臓を摘出し、重量測定、写真撮影後に凍結切片ブロック、パラフィン切片ブロック用にサンプリングし、残りのサンプルからマイクロソーム画分を抽出した。ヒトアルブミン濃度が高くなるに従って、血清アルブミン量の増加およびGPT値の低下が認められた(図3)。

【0095】

ヒトアルブミンが高値のマウスでは、肝臓全体が桃色を呈し、1部にTg(+)/SCIDの特徴である白色部位が残っているマウスも見られた。また、1部が赤色を呈した肝臓も見られ、その部位はuPA導入遺伝子の欠損により正常化したマウスの肝細胞と考えられた。

【0096】

肝臓のそれぞれの葉の凍結切片を作製し、ヒト特異的cytokeratin 8/18抗体(

ICN Pharmaceuticals, Inc, Ohio) を反応させた後、Peroxidase標識DAKO EnvisionTM (DAKO CORPORATION, CA)で染色した。それぞれの葉について、切片面積あたりのcytokeratin 8/18陽性部位の割合を算出した(図4、5)。ヒトアルブミン分泌量が多いマウスでは、cytokeratin 8/18陽性肝細胞の面積の割合が高かった。陽性細胞が80%を越えているマウスも観察された。

2.7 マイクロゾームにおけるP450分子種の解析

マウスから採取したマイクロゾーム画分におけるP450分子種の発現を、P450の分子種に対する抗体(第一化学薬品株式会社、東京)を用いてウェスタンブロット分析により検出した。その結果、ヒトアルブミンが高かったマウスにおいて、ヒト特異的な分子種であるCYP2C9の発現が認められた(図6)。

実施例2: キメラマウスからのヒト肝細胞の分離と、モノクローナル抗体によるヒト肝細胞純化

実施例1で作成したキメラマウスからコラゲナーゼ灌流法により肝細胞を分離した。コラゲナーゼの濃度は0.05%、処理時間は9分とした。肝細胞には、ヒト肝細胞とマウス肝細胞が混入していると考えられるが、マウス肝細胞の方がヒト肝細胞に比べて、コラゲナーゼによる毒性が高いため、分離した肝細胞の多く(約80%)はヒト肝細胞により占められていた。

【0097】

さらに、ヒト肝細胞の純度を上げるため、マウス肝細胞は認識せずに、ヒト肝細胞の表面を特異的に認識するマウスモノクローナル抗体(実施例6で作成したハイブリドーマK8216が産生するモノクローナル抗体)を用いてヒト肝細胞のみを分離した。コラゲナーゼ灌流により分離したヒト肝細胞の占める割合が約80%であったマウスの肝細胞に上記抗体を反応させ、さらにFITC標識マウスIgG抗体を反応させ、FACSを用いてFITC抗体に反応した細胞を分離した。その結果、ヒト肝細胞の純度が95%以上となった。

実施例3: キメラマウスから単離したヒト肝細胞のuPA-Tg/SCIDマウスへの再移植

実施例2で単離した肝細胞を、実施例1と同様にして別のuPA-Tg(+/-)/SCIDマウスに移植し、飼育した。その結果、マウス血中においてヒトアルブミン量の増

加が見られた（図7）。

実施例4：uPA導入遺伝子の半欠失による正常化マウス肝細胞の増殖抑制

uPA-Tg(+/-)/SCIDマウスおよびuPA-Tg(+)/SCIDマウスに、retrorsineを30または60 mg/kgを腹腔内投与した。その結果、uPA-Tg(+/-)/SCIDマウスにおけるuPA導入遺伝子の半欠失（uPA-Tg(+/-)）による正常化肝細胞のコロニーが減少した（図8）。

【0098】

次いで、retrorsineを60 mg/kgを腹腔内投与したuPA-Tg(+/-)/SCIDマウスおよびuPA-Tg(+)/SCIDマウスに実施例1と同様にしてヒト肝細胞を移植し、キメラマウスを作成した。その結果、uPA-Tg(+/-)/SCIDマウスをレシピエントするキメラマウスにおいても、uPA-Tg(+)/SCIDマウス由来のキメラマウスと同程度に血中ヒトアルブミン濃度が増加した。

実施例5：ヒト肝細胞キメラマウスへの抗マウスFas抗体投与

実施例1で作製したキメラマウスの1匹について、ヒト肝細胞移植から100日経過した時点で、マウス肝細胞のFas抗原に反応してマウス肝細胞のアポトーシスを誘導する抗マウスFas抗体（0.2 mg/g b.w.）を1週間間隔で2回腹腔内投与した。

【0099】

結果は図9に示したとおりである。このキメラマウスは、ヒト肝細胞移植から約80日以降、血中のヒトアルブミン濃度が減少傾向を示したが、抗マウスFas抗体の投与により、血中ヒトアルブミン濃度を著しく上昇させた。

【0100】

以上の結果、この発明の方法においては、ヒト肝細胞移植後のキメラマウスに抗Fas抗体を投与することが、ヒト肝細胞の増殖および／または活性化に有効であることが確認された。

実施例6：ヒト増殖性肝細胞を認識するモノクローナル抗体の作製

1. ヒト肝細胞の培養

ヒト肝臓組織よりコラゲナーゼ灌流法により、細胞分散液を得た。細胞分散液を低速遠心分離（50g、2分）し、その沈殿画分を牛胎児血清、ヒト血清、EGF、

ニコチンアミド、活性持続型ビタミンCを添加したDulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) を用い、マイトマイシンC処理したSwiss 3T3細胞と混合培養した。Swiss 3T3細胞は10日毎に添加した。培養7日目頃よりヒト肝細胞のコロニーが観察された。コンフルエントに増殖した肝細胞をEDTA/Trypsinを用いて継代した。継代は、子供の肝細胞では6-9回継代でき、60才以上の患者の肝細胞は3-4回しか継代できなかった(図10)。もっとも高い増殖能を示した子供(12才)の肝細胞を抗原として用いた(図11)。

2. 動物の免疫

上記方法により、3-5回継代培養した子供(12才)の肝細胞を培養皿上で増やした。コンフルエントに増殖した細胞(約 1×10^7 個)を、PBS(リン酸緩衝塩類溶液)で洗浄した後、PBSを取り除き、セルスクレーパーで掻き取って回収し、PBS約1mlに懸濁した。これを6週齢のBalb/cマウスの腹腔内に投与した。さらに20日後または30日後に、同様の方法で免疫を行った。

3. 細胞融合

2回の免疫後、抗体価の上昇がみられたため、3回目の免疫(boost)の72時間後、1匹の免疫動物より脾臓を摘出、脾臓細胞を採取した。この脾臓細胞とマウスミエローマ細胞(細胞名NS-1)を細胞融合し、96-well plateに372 well播種、培養した。

4. ハイブリドーマのスクリーニング

1次スクリーニング(ELISA、組織染色)：

得られた融合細胞の培養上清の抗原に対する反応性をELISAにより測定した。測定は以下の方法により実施した。抗原として用いた肝細胞を96-well plateに播種し、培養後PBSで洗浄、乾燥させ-80℃で保存しておいたものに、培養上清を反応させた。次に酵素標識の抗マウスIgGまたは抗マウスIgM抗体を反応させ、基質を加えて発色させ、その吸光度を測定した。その結果、融合細胞372サンプルの吸光度の平均は0.149 (SD: 0.099) で、このうち吸光度0.20以上(81サンプル、約20%)のサンプルを陽性とした。また目視において、吸光度0.15以上でも発色が確認されたことから、0.15~0.20のサンプル(46サンプル)については、組織染色を行い反応性を確認した。その中から、興味深い染色パターンを示した13サ

ンプルについてのみ陽性サンプルとした。選択した陽性サンプル、94サンプルをスケールアップしてさらに培養し、培養上清を回収後、細胞を凍結保存した。

5. 2次スクリーニング (ELISA、組織染色) :

1次スクリーニングで選んだ94サンプルから、スケールアップ後の培養上清の抗原に対する反応性を1次スクリーニングと同様のELISAにより測定し、陽性サンプル、88サンプルを選んだ。さらに、これらのサンプルの、組織における反応性を組織染色により調べた。そのなかから、肝細胞の細胞膜や、門脈域の肝細胞に特異的に反応するハイブリドーマを含むサンプル、または、そこからクローニングによって得られたクローンの培養上清について、分離直後のヒト肝細胞への反応性を調べた。

【0101】

組織において門脈域の肝細胞膜が染まる融合サンプル (No. 23) (図12) について、分離直後の肝細胞表面における反応性を、FACS (Fluorescence activated cell sorting) を用いて解析した。成人男性 (46才および49才) の肝臓からコラゲナーゼ灌流、低速遠心により得られた細胞を、このサンプルの培養上清で37℃、30分処理し、次にFITC標識した抗マウスIgG抗体を37℃、30分処理することにより、FACSでの検出を可能にした。その結果、肝細胞集団の一部 (1~2%) の細胞がこのサンプルに反応した (図13)。そこで、これらの細胞集団をR2、未反応の細胞集団をR3として分取し、培養した。また分取前の肝細胞も同様に培養した。その結果、分取前の肝細胞では、前述したように、培養7日目頃より、コロニー形成が観察された。一方、R3画分においては、コロニーを形成する細胞は観察されなかったが、No. 23に反応したR2画分において、多くのコロニーが観察された (図14)。また、継代培養ヒト肝細胞への反応性をFACSにより調べたところ、約80%の細胞が陽性であった (図15)。すなわち、継代培養ヒト肝細胞のうち培養過程で分化した細胞は認識せず、増殖性肝細胞のみを認識していると考えられた。このことから、No. 23には、コロニーを形成する細胞を特異的に認識するハイブリドーマが含まれている可能性が示唆された。No.23サンプルからクローニングにより得られたクローンについても分離直後の肝細胞表面における反応性をFACSを用いて解析した。その結果、同様の反応性を示すクローンが3クローン

得られた。これらの中から、1クローン (Mouse-Mouse hybridoma K8223) を2002年3月6日付で独立行政法人産業技術総合研究所特許生物寄託センターに特許寄託した (受託番号FERM P-18752)。

6. モノクローナル抗体の作成

前記のハイブリドーマ (K8223株) 細胞を培養することによって、さらに、マウス腹腔内にハイブリドーマ細胞を注射し、腹水からモノクローナル抗体を採取することにより、増殖性ヒト肝細胞と特異的に結合するモノクローナル抗体を得た。

実施例7：ヒト肝細胞を特異的に認識するモノクローナル抗体の作製

非ヒト肝細胞は認識せず、ヒト肝細胞のみを認識するモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマを、実施例6の1次スクリーニングで選択した94サンプルのうちELISAにおいて陽性であった88サンプルからヒト肝臓組織における組織染色により選択した。肝細胞の細胞膜が部域に関係なく一様に染まるハイブリドーマ培養上清3サンプルについて、培養ヒト肝細胞や分離直後のヒト肝細胞および非ヒト動物 (マウス、ラット) 肝細胞の細胞表面への反応性をFACSを用いて解析した。成人男性 (46才 or 68才) の肝臓からコラゲナーゼ灌流、低速遠心により得られた細胞を、選択した3サンプルの培養上清で37℃、30分処理し、次にFITC標識した抗マウスIgG抗体を37℃、30分処理することにより、FACSでの検出を可能にした。FACSによるスクリーニングの結果、ヒトの肝細胞のみに反応し、マウスおよびラット肝細胞には反応しないハイブリドーマ (クローニング前) を1サンプル選択した。これより得られたモノクローンのハイブリドーマ培養上清、2クローンも同様の反応性を示した (図15)。選択したハイブリドーマ培養上清での組織染色ではヒト肝組織の毛細胆管と思われる部位が染まり、その染色性において部域差は認められなかった。またマウスおよびラット肝組織はこのハイブリドーマ培養上清に対していずれも陰性であった。以上の結果より、非ヒト動物の肝細胞は認識せず、ヒト肝細胞を特異的に認識する抗ヒト肝細胞モノクローナル抗体を産生するハイブリドーマが得られた。このハイブリドーマK8216株を2002年3月6日付で独立行政法人産業技術総合研究所特許生物寄託センターに特許寄託した (受託番号FERM P-18751)。

【 0 1 0 2 】

このK8216株から実施例 6 と同様の方法で、モノクローナル抗体を得た。

【 0 1 0 3 】

【発明の効果】

以上詳しく説明したとおり、この出願の発明によって、ヒト肝細胞を、その機能を保持した状態で大量に増殖させることが可能となる。また、肝臓内の細胞の多くがヒト肝細胞に置換したキメラマウスが提供される。このキメラマウスやヒト肝細胞を用いた化合物の薬物代謝試験や安全性試験が可能となる。

【 0 1 0 4 】

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> Japan Science and Technology Corporation and
Hiroshima Industrial Technology Organization

<120> A method for proliferating human hepatocytes and a method for
obtaining human hepatocytes

<130> NP02088

<160> 6

<210> 1

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthesized oligonucleotide

<400> 1

gtcttggtc gctgcaatc

19

<210> 2

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthesized oligonucleotide

<400> 2

cgggagactg aggcaggag

19

<210> 3

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthesized oligonucleotide

<400> 3

ccgcctcctg ggttcaagcg a

21

<210> 4

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthesized oligonucleotide

<400> 4

ggatgcaggg atgatgttc

19

<210> 5

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthesized oligonucleotide

<400> 5

tgcaccacca actgcttag

19

<210> 6

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthesized oligonucleotide

<400> 6

cagaagactg tggatggccc tc

22

【図面の簡単な説明】

【図 1】

補体抑制剤のヒトアルブミン濃度への効果を試験した結果である。

【図 2】

補体抑制剤の体重に対する効果を試験した結果である。

【図 3】

マウスヒト血中アルブミン濃度とヒト肝細胞による置換率および肝機能の相関を示したグラフである。

【図 4】

ヒト特異的サイトケラチン8/18抗体による免疫染色像である。

【図 5】

ヒト特異サイトケラチン8/18抗体による免疫染色の拡大像である。

【図 6】

ヒト肝細胞を移植したマウス肝臓マイクロゾームにおけるヒト特異的CYP2CPのウェスタンブロット分析の結果である。

【図 7】

ヒト肝細胞を再移植したマウス血中ヒトアルブミン濃度を試験した結果である。

【図 8】

uPA(+)/SCIDマウスへのRetrorsine投与の効果を試験した結果である。

【図9】

ヒト肝細胞キメラマウスに抗マウスFas抗体を投与したマウス血中のヒトアルブミン濃度を試験した結果である。

【図10】

様々な年齢の患者から採取した肝細胞を培養した時の増殖曲線である。

【図11】

モノクローナル抗体を作るために抗原として用いた培養ヒト肝細胞の位相差顕微鏡像である。

【図12】

融合サンプル (No. 23) の、ヒト肝組織における反応性を蛍光抗体染色により観察した像である。

【図13】

融合サンプル (No. 23) の、分離直後のヒト肝組織表面における反応性をFACSにより解析した結果である。

【図14】

融合サンプル (No. 23) に反応した細胞集団 (R2) と未反応の細胞集団 (R3) を分取し、培養した時の位相差顕微鏡像である。

【図15】

融合サンプル (No. 23) の、継代培養ヒト肝細胞表面における反応性をFACSにより解析した結果である。

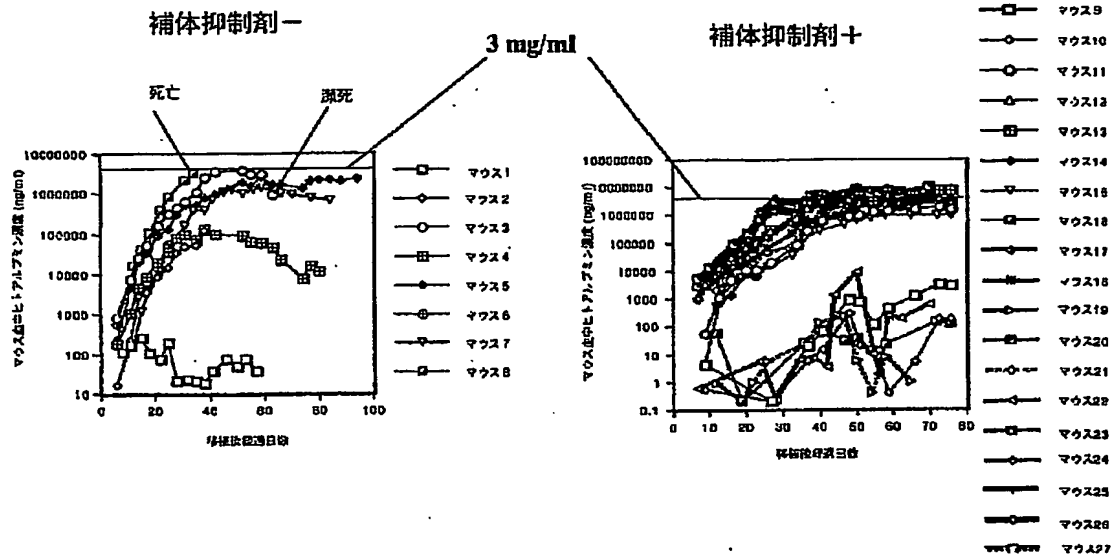
【図16】

ハイブリドーマ (K8216) の、分離直後のヒト、マウス、ラット肝細胞表面における反応性をFACSにより解析した結果である。

【書類名】

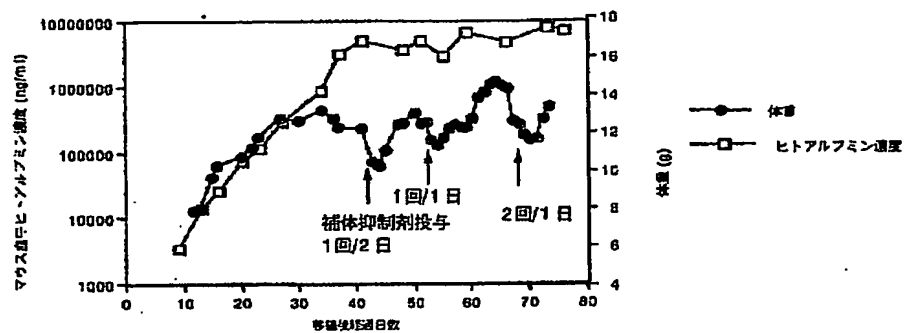
図面

【図 1】

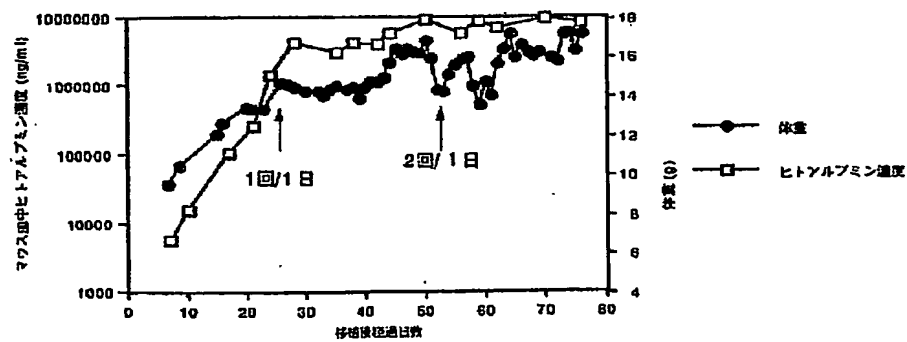


【図 2】

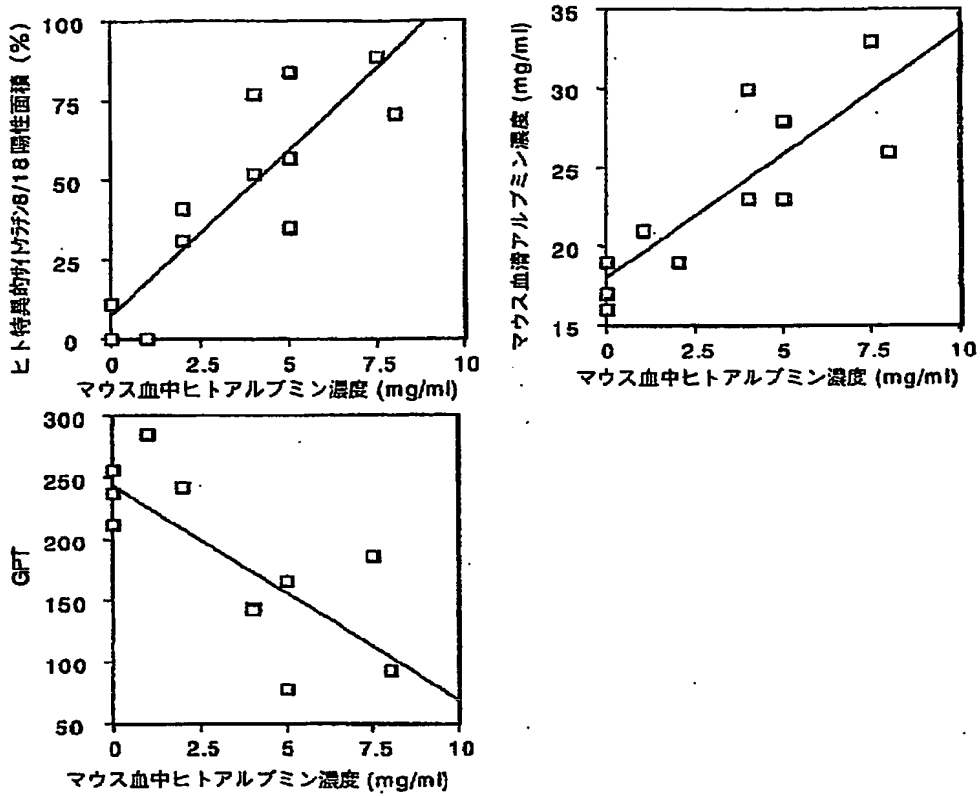
マウス13



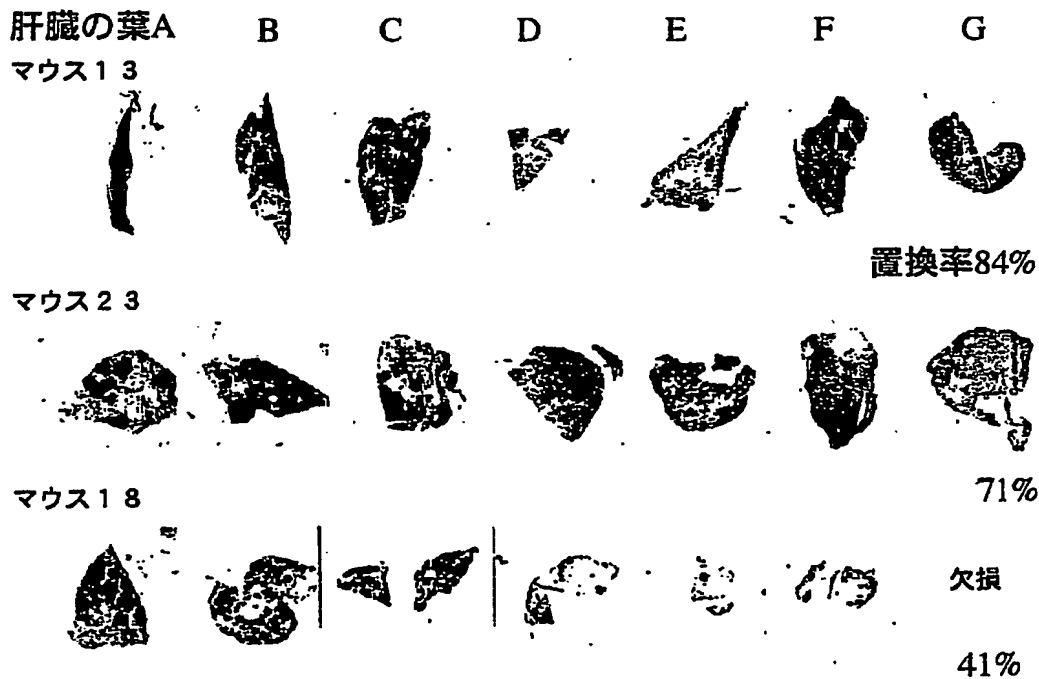
マウス24



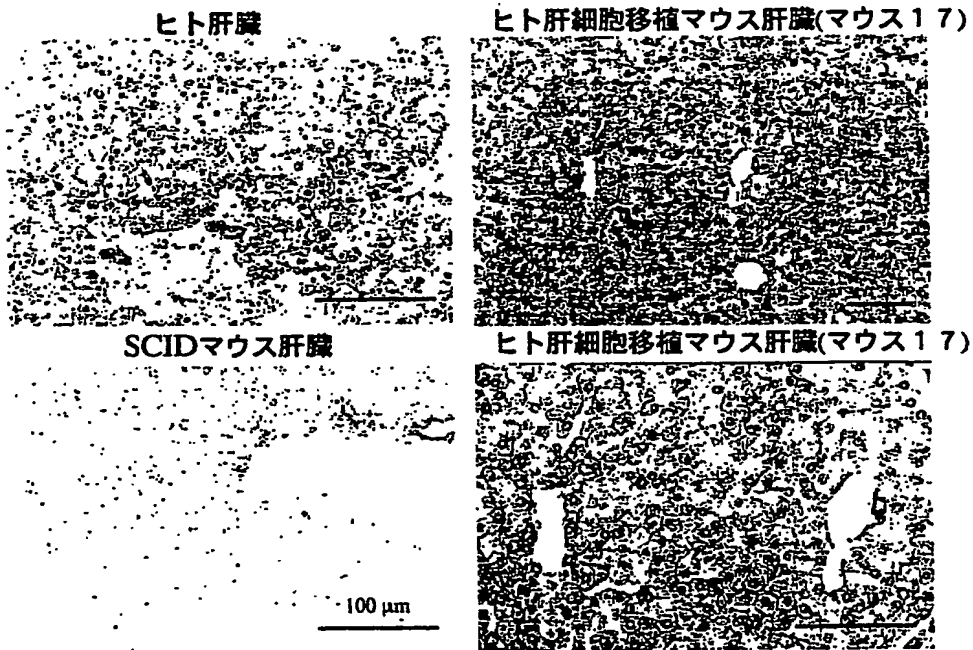
【図 3】



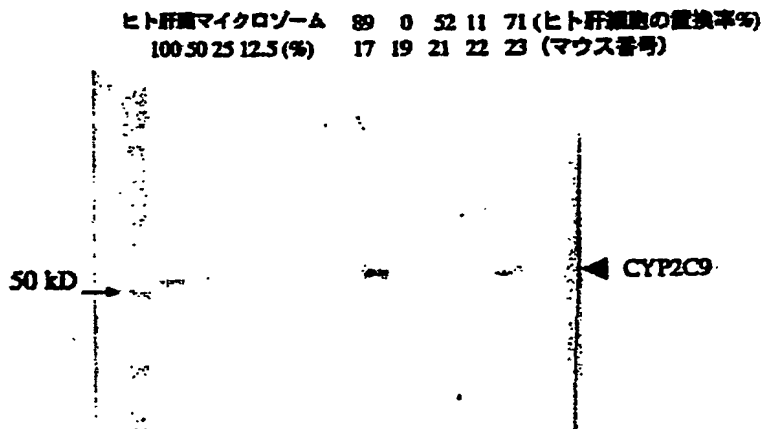
【図 4】



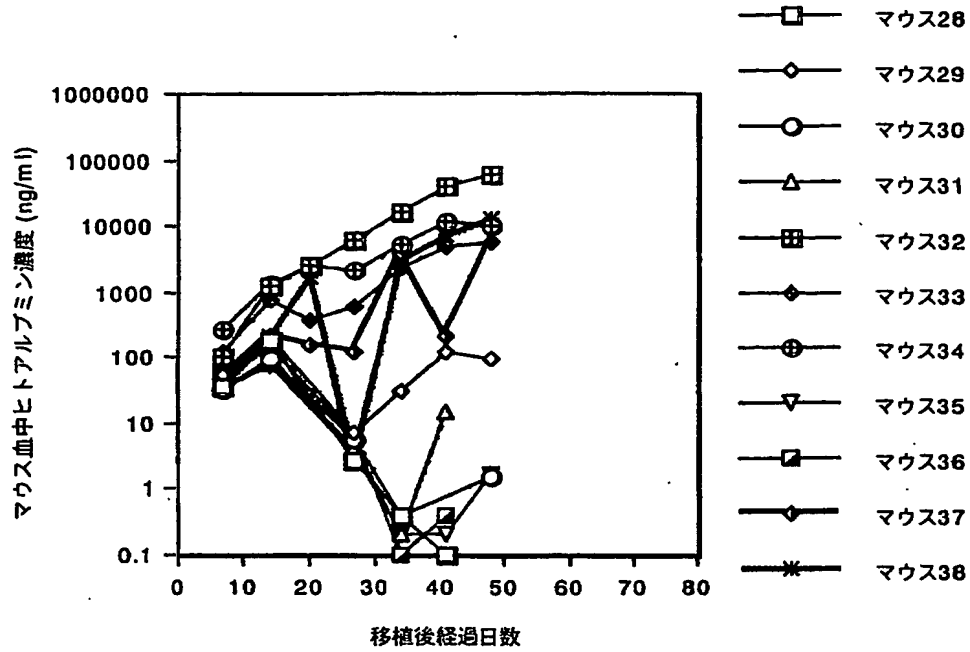
【図5】



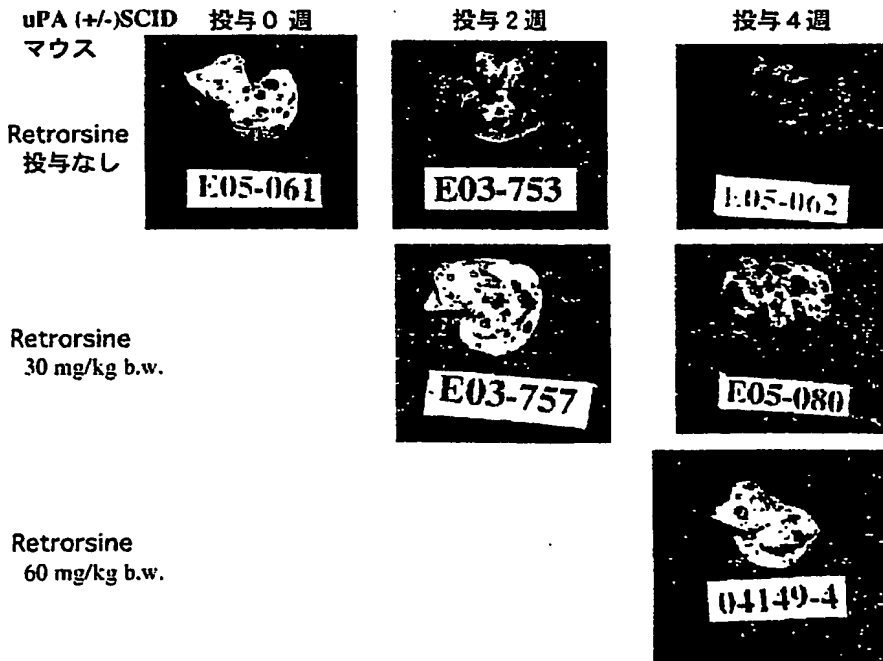
【図6】



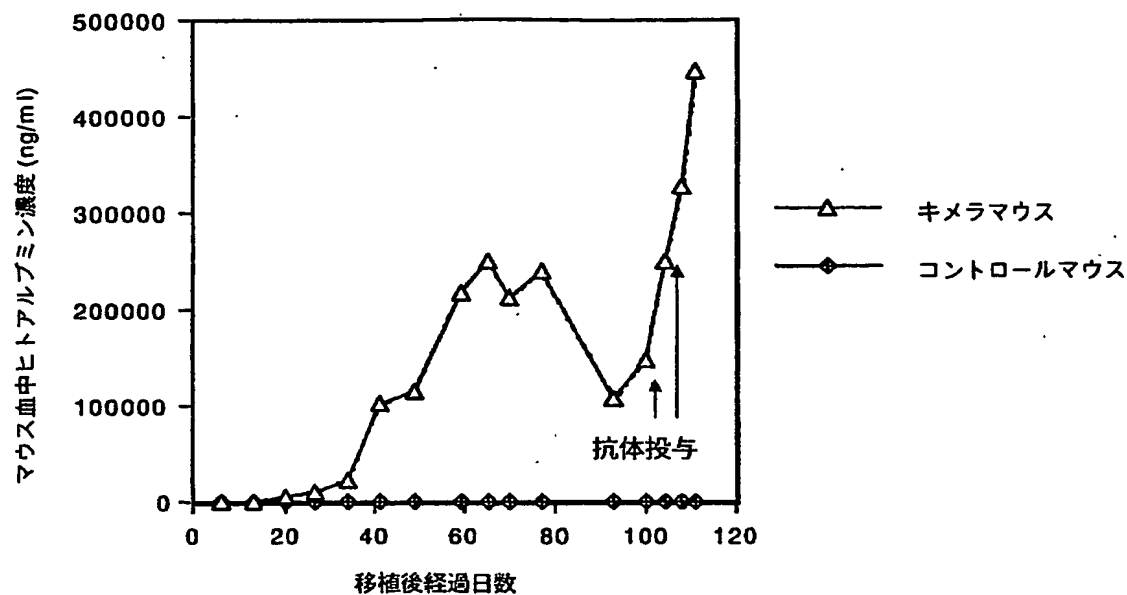
【図 7】



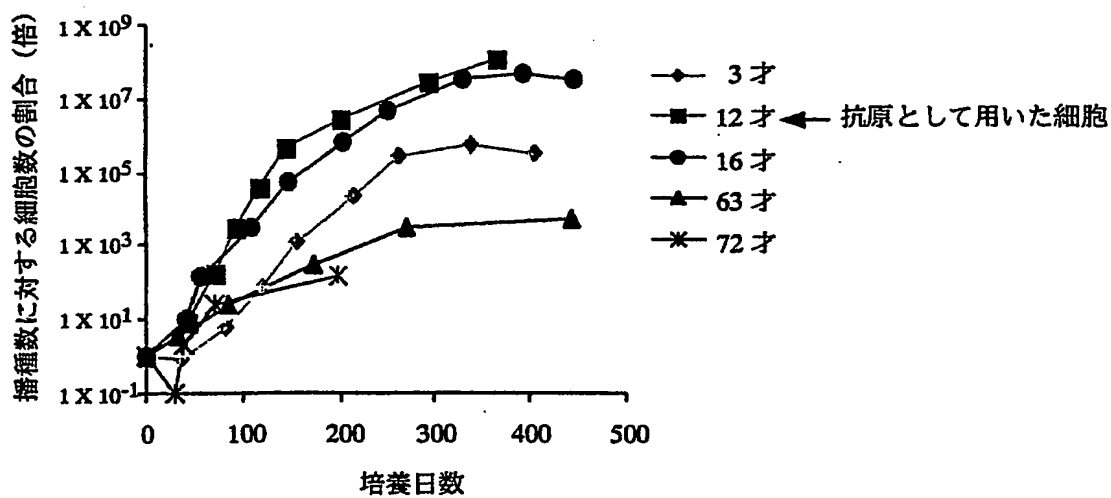
【図 8】



【図 9】



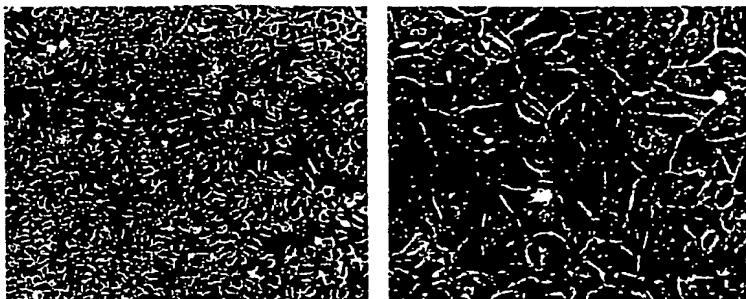
【図 10】



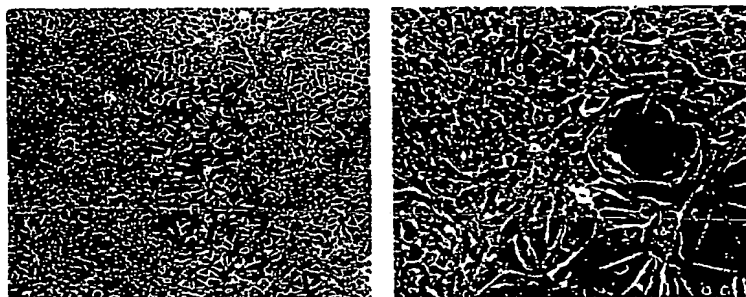
【図11】

モノクローナル抗体を作るために抗原としたヒト肝細胞（12才）
初代培養

30日目

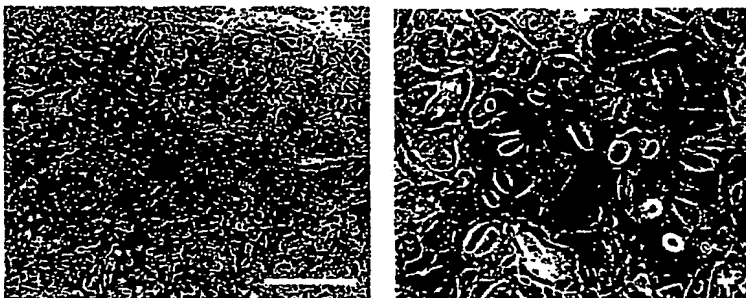


43日目



継代培養（3回）→マウス免疫

33日目



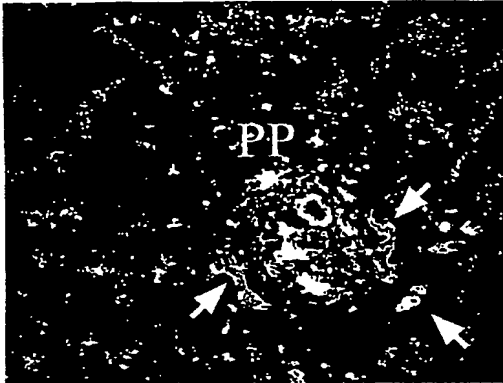
Bar, 100 μ m

【図12】

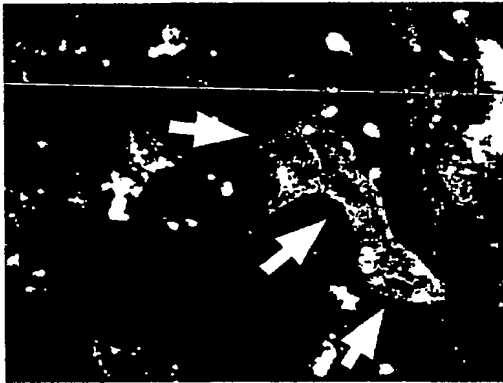
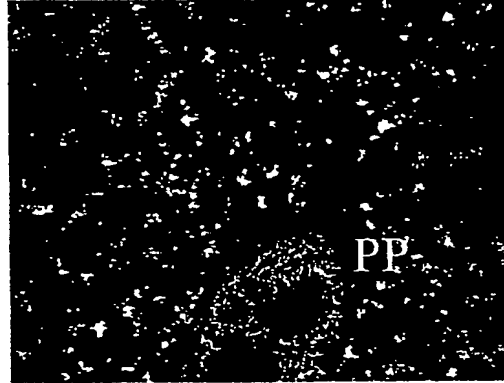
ヒト組織 (62才)

ハイブリドーマ培養上清 (K8223)

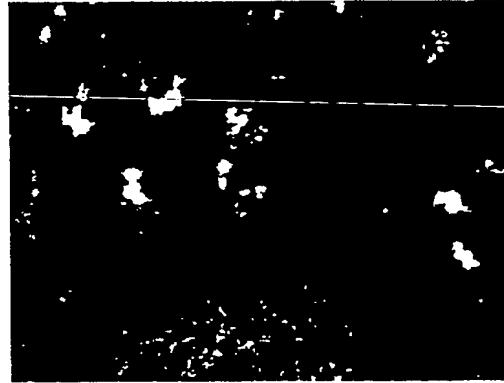
K8223



1次抗体なし

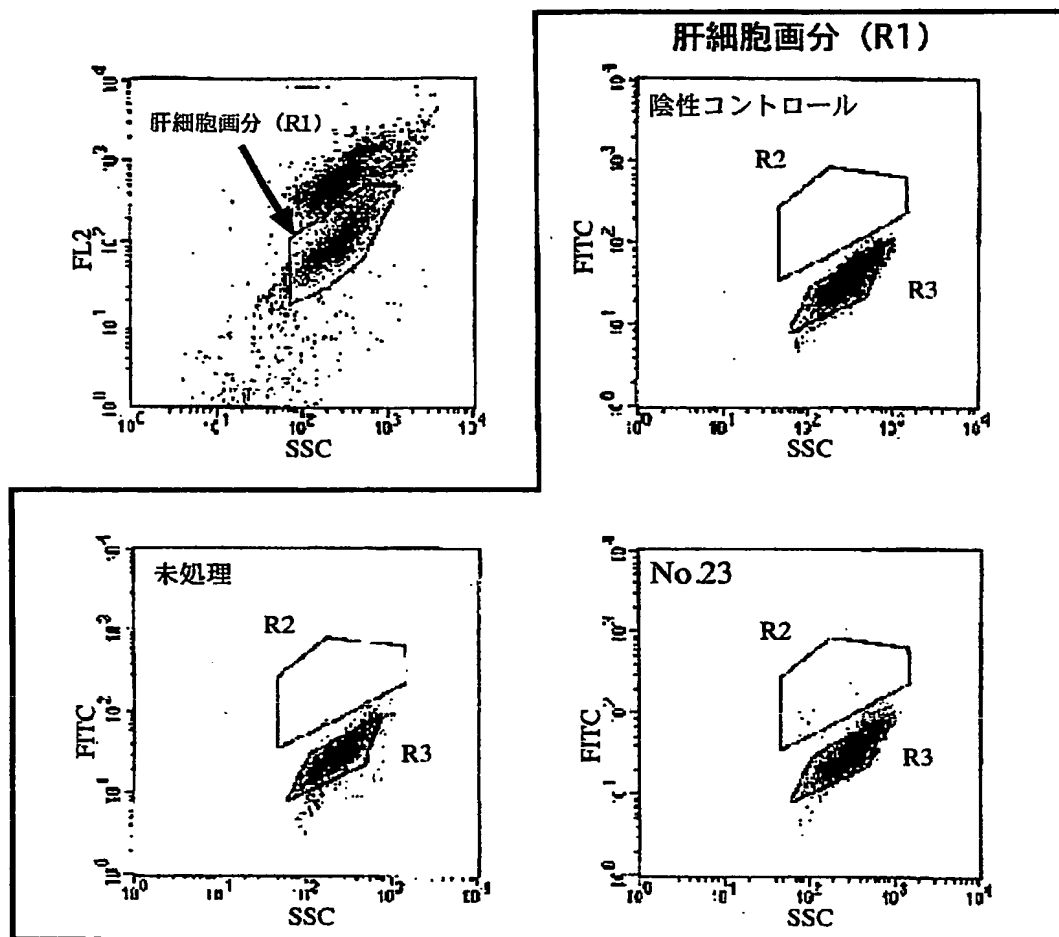


Bar, 50 μ m



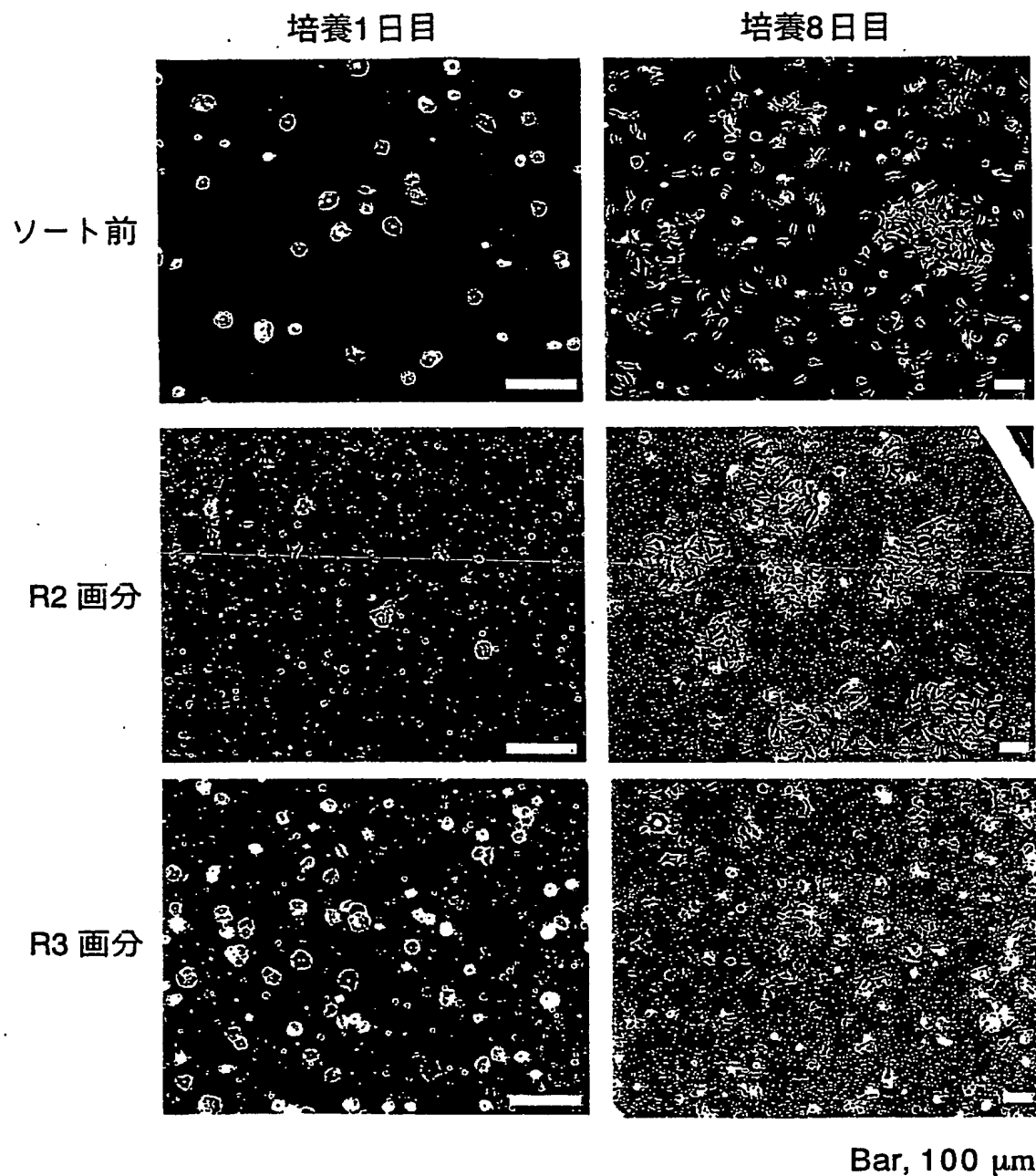
PP : 門脈域

【図13】



【図14】

ハイブリドーマ培養上清：No.23
単離ヒト肝細胞 (49才)



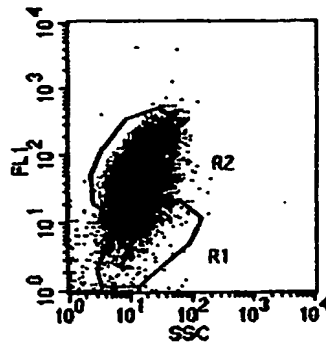
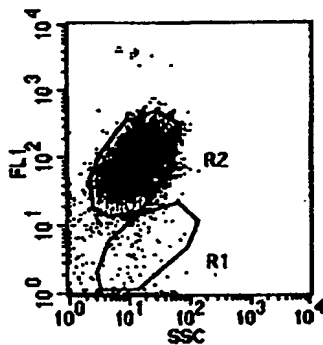
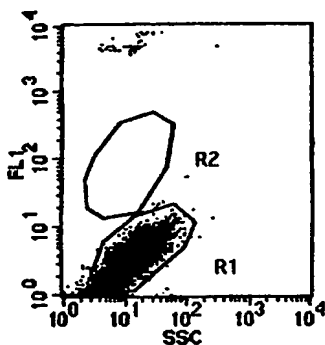
【図 15】

培養ヒト肝細胞 (12才、男児、継代回数 5)

ネガティブコントロール

ポジティブコントロール
(免疫マウス血清)

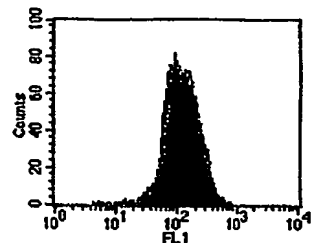
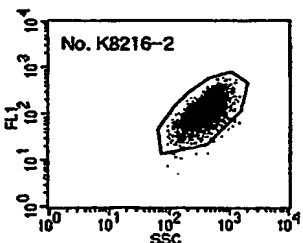
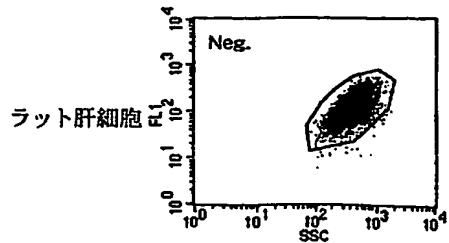
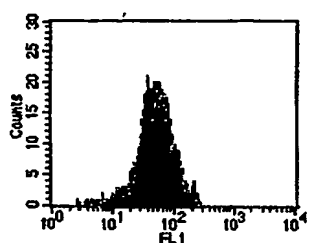
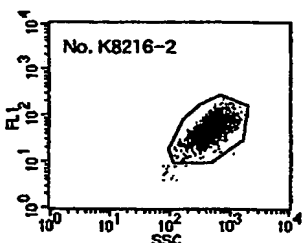
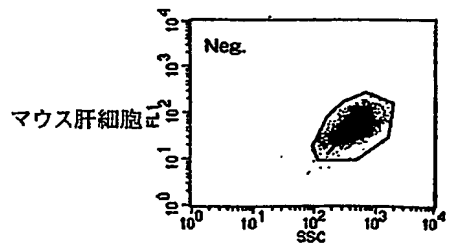
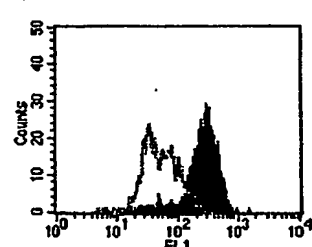
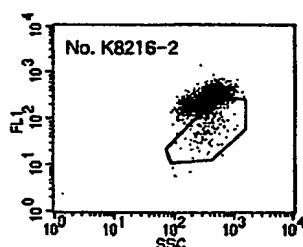
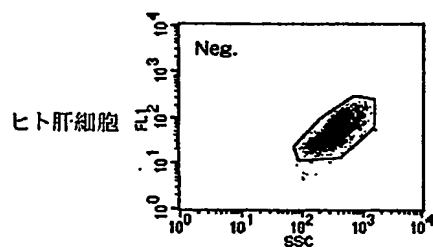
No. 23 (IgG)



Region	Events	% Gated
R1	75	0.75
R2	9415	94.15

Region	Events	% Gated
R1	694	6.94
R2	7921	79.21

【図 16】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 マウス体内でヒト肝細胞を十分に増殖させるための改良された方法を提供する。

【解決手段】 免疫不全肝障害マウスの肝臓にヒト肝細胞を移植し、補体抑制剤を投与しながらこの細胞移植マウスを飼育することによって、移植したヒト肝細胞をマウス肝臓で増殖させる。

【選択図】 なし

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [396020800]

1. 変更年月日	1998年 2月24日
[変更理由]	名称変更
住 所	埼玉県川口市本町4丁目1番8号
氏 名	科学技術振興事業団

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [596063056]

1. 変更年月日 1996年 3月29日
[変更理由] 新規登録
住 所 広島県広島市中区千田町3丁目7-47
氏 名 財団法人広島県産業技術振興機構
2. 変更年月日 2002年 6月 7日
[変更理由] 名称変更
住 所 広島県広島市中区千田町3丁目7-47
氏 名 財団法人 ひろしま産業振興機構

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☐ FADED TEXT OR DRAWING
- ☒ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.